

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZAL GANGLİA VE HİPOKAMPUSE UNİLATERAL AAV ARACILI
ALFA-SİNÜKLEİNİN ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULAN
PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNİN DAVRANIŞSAL VE
PATOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Sevgi Uğur MUTLUAY

**Farmakoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2017**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZAL GANGLİA VE HİPOKAMPUSE UNİLATERAL AAV ARACILI
ALFA-SİNÜKLEİNİN ENJEKSİYONU İLE OLUŞTURULAN
PARKİNSON HASTALIĞI MODELİNİN DAVRANIŞSAL VE
PATOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Sevgi Uğur MUTLUAY

Farmakoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL

ANKARA

2017

**Bazal Ganglia ve Hipokampuse Unilateral AAV Aracılı Alfa-Sinükleinin Enjeksiyonu
ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinin Davranışsal ve Patolojik Olarak
Değerlendirilmesi
Sevgi Uğur Mutluay**

Bu çalışma 09.08.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Farmakoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Bülent Elibol
(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi)

(imza)



Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel
(Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi)

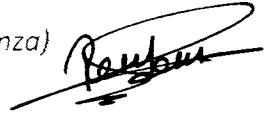
(imza)



Üye:

Prof. Dr. Remzi Erdem
(Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi)

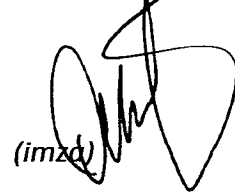
(imza)



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Tarih 05 Eylül 2017

(imza)



Prof. Dr. Diclehan Orhan y.

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)

• Tezimin/Raporumun 21.06.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.


(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

o Tezimin/Raporumun 09/08/2018 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

06/09/2017

Ecz. Sevgi Uğur MUTLUAY



ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Yrd.Doç.Dr. Banu Cahide Tel danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Sevgi Uğur MUTLUAY



TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim süresince yanımda olan, ilgisini ve desteğini esirgemeyen danışmanım Yard. Doç. Dr Banu C. Tel'e,

Farmakoloji eğitimime katkıda bulunan tüm hocalarıma,

Bilgi, tecrübe ve görüşlerini paylaşarak tez çalışmalarına yön veren Prof. Dr. Bülent Elibol, Prof. Dr. Esen Saka-Topçuoğlu ve Dr. Ayşe Ulusoy'a,

Değerli fikirleri ve yorumları ile çalışmalarımı zenginleştiren ve bu süreçte daima ilham verici olan Doç. Dr Emine Eren-Koçak ve Dr. Gül Yalçın-Çakmaklı'ya,

Altyapı olanaklarını cömertçe paylaşan Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü hocaları ve çalışanlarına,

Birlikte olmaktan mutluluk duyduğum ve dostluklarıyla her zaman yanımda olan Farmakoloji Anabilim Dalı asistanlarına,

Teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (014 D08 301 007-701) tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Mutluay, S.U., Bazal ganglia ve hipokampuse unilateral AAV aracılı alfa-sinükleinin enjeksiyonu ile oluşturulan Parkinson hastalığı modelinin davranışsal ve patolojik olarak değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2017. Çalışmamızda, Parkinson hastalığının motor ve motor dışı bulgularının incelenmesine yönelik bir hayvan modeli geliştirilmesi, alfa-sinüklein patolojisinin moleküler düzeyde incelenmesi amacıyla; substansiya nigra (SN), dentat girus (DG) ve bu yapıların her ikisine beraber, AAV-aracılı, tek taraflı alfa-sinüklein ve GFP enjeksiyonları gerçekleştirildi. İmmunoblotlamave immunohistokimya teknikleri ile alfa-sinüklein ve GFP'nin hedef yapılardaki ifadesi gösterildi. Alfa-sinükleinin, striatal ve hipokampal dokularda sinaptofizin kaybına yol açtığı, SN ve striatumda, tirozin hidroksilaz yoğunluğunun intakt hemisferde daha fazla, hipokampuste NeuN yoğunluğunun iki hemisferde de benzer olduğu gözlemlendi. Öğrenme ve bellek disfonksiyonun değerlendirildiği yeni nesne tanıma ve Morris su labirenti testlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Sükroz tercih testinde alfa-sinükleinin yalnız SN'ye enjeksiyonu ile hedoninin değişmediği, DG alfa-sinüklein enjeksiyonu ile arttığı gözlemlendi. Yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyetinin, SN alfa-sinüklein grubunda artma, DG alfa-sinüklein grubunda azalma eğilimi gösterdiği, SN+DG alfa-sinüklein grubunda kontrol grubu ile benzer olduğu gözlemlendi. Silindir testinde tüm gruplarda motor asimetri gözlenirken, SN ve DG gruplarında kontrole göre istatistiksel anlamlılığa ulaşıldı. Açık alan testinde grupların lokomotor aktiviteleri benzer bulundu. Apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testinde bütün grupların lokomotor aktivitesi azalmakla beraber istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Apomorfinle indüklenen dönme testinde grupların hiçbirinde istatistiksel anlamlılıkta bir dönme davranışı gözlenmedi. Alfa-sinüklein aşırı ifadesinin sonucu yeterli nöron ölümü oluşturmamakla beraber sinaptik disfonksiyona neden olması dolayısıyla oluşturduğumuz bu model, iyi bir deneysel Parkinson modeli olmaya adaydır.

Anahtar kelimeler: Parkinson Hastalığı, Adeno ilişkili viral vektör, Hipokampus, Alfa-sinüklein, Unilateral lezyon

Bu çalışma (014 D08 301 007-701) Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Mutluay, S.U., Behavioral and pathological evaluation of a Parkinson's Disease model developed by AAV- mediated delivery of alpha-synuclein unilaterally to basal ganglia and to hippocampus, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmacology Programme Masters's Thesis, Ankara, 2017. In this thesis, we aim to develop an animal model that represents both motor and non-motor symptoms together by injecting unilateral AAV-mediated alpha-synuclein or GFP to substantia nigra (SN), dentate gyrus (DG) or both and to validate alpha-synuclein pathology in this model. Alpha-synuclein and GFP overexpression was observed in the target areas by immunoblotting and immunochemistry techniques. Alpha-synuclein overexpression led to loss of synaptophysin, a structural synaptic protein. Tyrosine hydroxylase density in SN and striatum was lower on the injected side comparing to intact hemisphere and NeuN density did not differ between the hemispheres. In novel object recognition and Morris water maze tests learning and memory functions did not differ between groups. In sucrose preference test overexpression of alpha-synuclein in SN alone did not change hedonic behavior whereas alpha-synuclein overexpression in DG increased hedonia. In elevated plus maze test anxiety was inclined to increase in SN alpha-synuclein group, whereas a decrease was observed in DG alpha-synuclein group, and in SN+DG group it was similar to that of control. In cylinder test all groups showed motor asymmetry, and statistical significance was reached only in SN and DG groups. In open field test all groups had similar locomotor activity levels, in apomorphine-induced open field test there was a trend towards decreased activity in all groups. In apomorphine-induced rotation test none of the groups showed statistically significant turning behaviour. Although alpha-synuclein overexpression in SN, DG and SN+DG did not trigger an adequate neuronal death, synaptic dysfunction was observed hence this model is a potential candidate for Parkinson's disease model.

Key words: Parkinson's Disease, Adeno associated viral vector, Hippocampus, Alpha-synuclein, Unilateral lesion

This study (014 D08 301 007-701) was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Epidemiyoloji	3
2.2. Bazal Gangliyonlar	3
2.3. Hipokampus	7
2.4. Alfa-sinüklein	9
2.4.1. Yapı	9
2.4.2. Fizyolojik İşlevleri	11
2.4.3. Alfa-sinüklein ve PH Patolojisi	12
2.5. Motor ve Motor Dışı Belirtiler	15
2.6. Deneysel Hayvan Modelleri	16
2.6.1. Toksin-aracılı Modeller	16
2.6.2. Genetik Modeller	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Deney Hayvanları	28
3.2. Stereotaksik Cerrahi	28
3.3. Deney Grupları	29
3.4. Motor ve Bilişsel Deneyler	30
3.4.1. Yeni Nesne Tanıma Testi	31

3.4.2. Morris Su Labirenti Testi	32
3.4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	33
3.4.4. Sükroz Tercih Testi	34
3.4.5. Silindir Testi	34
3.4.6. Açık Alan Lokomotor Aktivite Testi	35
3.4.7. Apomorfinle İndüklenen Lokomotor Aktivite ve Dönme Testi	35
3.5. İmmünoblotlama	36
3.5.1. Beyin Kısımlarının Disseksiyonu	36
3.5.2. Doku Homojenizasyonu	37
3.5.3. Protein Tayini	37
3.5.4. Numunelerin Hazırlanması	38
3.5.5. Numunelerin Jele Yüklenmesi ve Yürütme	38
3.5.6. Proteinlerin Transferi	39
3.5.7. Membranların Blokajı ve Primer Antikorlarla İnkübasyonu	40
3.5.8. Sekonder Antikorlarla İnkübasyon ve Görüntü Alma	41
3.5.9. Görüntülerin Değerlendirilmesi	42
3.6. İmmünohistokimya	42
3.6.1. Beyinlerin Perfüzyonu	43
3.6.2. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması	43
3.6.3. <i>Antigen Retrieval</i> (AR)	44
3.6.4. İHK Boyama	45
3.6.5. Kullanılan Primer Antikorlar	46
3.7. İstatistiksel Analiz	46
3.8. Kullanılan Solüsyonlar	46
4.BULGULAR	48
4.1. Alfa-sinüklein ve GFP İfadesinin Kısa ve Uzun Süreli Belleğe Etkisi	48
4.2. Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin Öğrenme ve Uzaysal Belleğe Etkisi	50
4.3. Alfa-sinüklein ve GFP İfadesinin Anhedoniye Etkisi	52

4.4. Alfa-sinüklein ve GFP İfadesinin Anksiyeteye Etkisi	53
4.5. Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin Motor Asimetriye Etkisi	54
4.6. Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin Spontan Motor Aktiviteye Etkisi	55
4.7. Farklı Beyin Bölgelerinde Oluşturulan Tek Taraflı Lezyonun Derecesinin Değerlendirilmesi	57
4.8. Farklı Beyin Bölgelerindeki Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin İmmünoyotlama Yöntemi ile Değerlendirilmesi	57
4.9. Farklı Beyin Bölgelerindeki Sinaptofizin Miktarlarının İmmünoyotlama Yöntemi ile Değerlendirilmesi	59
4.10. Farklı Beyin Bölgelerindeki Alfa-sinüklein ve GFP İfadelerinin İmmünohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi	60
4.11. Farklı Beyin Bölgelerindeki Nöron Kaybının İmmünohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	75
7. KAYNAKLAR	77
8. EKLER	94
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

6-OHDA	6-Hidroksidopamin
AADC	Amino asit dekarboksilaz
AAV	Adeno ilişkili virüs
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AH	Alzheimer hastalığı
AR	<i>Antigen retrieval</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BG	Bazal gangliyonlar
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
DAT	Dopamin taşıyıcısı
DG	Dentat girus
EC	Entorinal korteks
ESS	Enterik sinir sistemi
GABA	Gama amino bütirik asit
GFP	<i>Green flourescent protein</i>
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus eksterna
GPi	Globus pallidus interna
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
İB	İmmunblotlama
İHK	İmmunohistokimya
KO	<i>Knock-out</i>
LC	Lewy cisimciği
LN	Lewy nörit
LRRK2	<i>Leucine-rich repeated kinase 2</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i> (Uzun dönemli potansiyalizasyon)
LV	Lentivirüs
MPP⁺	1- metil-4-fenilpiridinyum
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MSL	Morris su labirenti
NAc	Nükleus akumbens
NAC	<i>Non amyloid beta component</i> (Non amiloid beta komponent)
NE	Norepinefrin
PBS-t	<i>Phosphate buffered saline-Triton X</i>
PFA	Paraformaldehit

PH	Parkinson hastalığı
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation</i>
SF	Serum fizyolojik
SN	Substansiya nigra
SNc	Substansiya nigra pars kompakta
SNCA	Alfa-sinüklein geni
SNr	Substansiya nigra pars retikülata
SPN	<i>Spiny projection neurons</i>
SSS	Santral sinir sistemi
STN	Subtalamik çekirdek
Str	Striatum
STT	Sükroz tercih testi
TBS-t	<i>Tris buffered saline-Triton X</i>
TBST	<i>Tris buffered saline-Tween 20</i>
TH	Tirozin hidroksilaz
VA	Ventroanterior
VL	Ventrolateral
VMAT2	Veziküler dopamin taşıyıcısı
VTA	Ventral tegmental alan
WT	<i>Wild type</i> (Yabanıl tip)
YAL	Yükseltilmiş artı labirent
YNT	Yeni nesne tanıma

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Bazal gangliyonların temel döngüsü.	4
2.2.	Direkt, indirekt ve hiperdirekt yolaklar.	6
2.3.	Hipokampal formasyonun bağlantıları	8
3.1.	Motor ve bilişsel işlevlerin incelenmesine yönelik deneylerin tasarımı.	30
3.2.	Motor ve bilişsel işlevlerin incelenmesine yönelik deneylerin yapıldığı zaman dilimleri.	31
4.1.	Alfa-sinüklein ve GFP ekspresyonunun, kısa dönemde, yeni ve eski nesnelere geçirilen süreler etkisi.	48
4.2.	Alfa-sinüklein ve GFP ekspresyonunun, uzun dönemde, yeni ve eski nesnelere geçirilen süreler etkisi.	49
4.3.	Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarının, gün bazında, platform bulma latansları.	50
4.4.	Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarının beşinci günde platform bölgesini bulma latansları.	51
4.5.	Kontrol, Alfa-sinüklein ve GFP gruplarının beşinci günde platform bölgesinde geçirdikleri ortalama süreler.	52
4.6.	Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarında sükröz tercih yüzdeleri.	53
4.7.	Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarında açık kollarda geçirilen sürenin toplam süreye oranı.	54
4.8.	Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarının ipsilateral ön ayak kullanma yüzdeleri.	55
4.9.	Açık alan ve apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite alan testlerinde grupların katettikleri toplam mesafeler.	56
4.10.	Açık alan ve apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testlerinde grupların ortalama hızları.	57
4.11.	Hipokampus ve striatum yapılarında alfa-sinüklein ve GFP ifadesinin gösterilmesi.	58
4.12.	Alfa-sinüklein ve GFP ekspresyonunun hipokampüsteki sinaptofizin miktarına etkisi.	59
4.13.	Alfa-sinüklein ve GFP ekspresyonunun striatumdaki sinaptofizin miktarına etkisi.	60
4.14.	Alfa-sinüklein immünohistokimyasal boyaması.	61
4.15.	GFP immünohistokimyasal boyaması.	61
4.16.	Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimyasal boyaması.	62
4.17.	NeuN immünohistokimyasal boyaması.	63

TABLolar

Tablo		Sayfa
2.1.	Toksin aracılı modellerin karşılaştırılması.	18
2.2.	Viral vektör aracılı alfa-sinüklein modelleri.	21



1.GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH) substansiya nigra pars kompaktada (SNc) yer alan dopaminerjik nöronların kaybı, nöron kaybına bağlı olarak striatum (Str) dopamin miktarının azalması, ayrıca Lewy cisimciklerinin (LC) beyinde yaygın ifadesi ile karakterize, ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. PH klinikte; rijidite, istirahat tremoru, postural instabilite, bradikinezi ve harekete başlamada zorluk gibi motor belirtiler ile kendini gösterir. Hastalığın tanısı çoğunlukla motor belirtiler üzerinden konulsa da, hastaların yaşam kalitesini en az motor bozukluklar kadar etkileyen motor dışı belirtiler de mevcuttur. Bu belirtiler; bilişsel bozukluklar, depresyon, anksiyete, uyku bozuklukları, otonomik disfonksiyon ve duyuşsal anormallikleri içerir. Motor dışı belirtiler hastalığın her evresinde motor bozukluklara eşlik edebilir, bazıları motor belirtilerden önce ortaya çıkabilir.

PH'de görülen motor bozukluklar nigrostriatal yolağın disfonksiyonu ile bir ölçüde açıklanabilse de hastalığın patofizyolojisi ve altta yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Günümüzde kullanılan deneysel PH modellerinin ayrı ayrı avantajları olmakla beraber, hastalığı hem moleküler hem klinik düzeyde tamamiyle yansıtan bir model bulunmamaktadır. Mevcut PH modelleri; dopaminerjik nöronların akut harabiyeti ilkesine dayanan toksin aracılı modeller ve PH'de görülen patolojik olayların genetik modifikasyonlarla taklit edildiği genetik modeller olarak ikiye ayrılabilir. Hastalığın karakteristik göstergesi olan Lewy cisimciklerinde (LC) alfa-sinüklein proteinine rastlanması (1) ve alfa-sinüklein gen mutasyonlarının PH ile ilişkisinin gösterilmesiyle beraber (2-6) proteinin aşırı ifadesine dayanan modeller geliştirilmiştir. Alfa-sinükleinin aşırı ifadesi, ilk olarak, viral vektörler aracılığıyla sıçan SN'sinde unilateral olarak gerçekleştirilmiştir (7,8). Proteinin nigral dopaminerjik nöronlardaki artmış ifadesinin hücreşel ve aksonal patolojilere yol açtığı, progresif nöron kaybına neden olduğu gözlenmiştir. Daha sonraki yıllarda, benzer toksik etkiler, adeno ilişkili viral vektörler (AAV) kullanılarak, fare ve primatlarda da gösterilmiştir (9,10). Proteinin aşırı ifadesinin viral vektörler aracılığıyla sağlandığı modeller, toksin aracılı modellerin aksine, hastalığın ilerleyici seyrini yansıtır. Ayrıca toksisitenin istenilen beyin bölgesinde oluşturulmasına olanak verirler. Bugüne kadar denenen

viral vektör aracılı modellerin çoğunda, orta beyin dopaminerjik nöronları hedeflenerek proteinin aşırı ifadesi yalnızca bu nöronlarda gerçekleştirilmiştir (11). Ancak hastalığın motor dışı belirtilerinin, bazal gangliya (BG) yapıları dışında; hipokampal yapılarla, raphe nucleus, locus coeruleus, önbeyin, olfaktör alan ve kortikal alanlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (12–14).

Bu tez çalışmasında; hastalığın patogenizde görülen ilerleyici nörodejeneratif süreci taklit eden, hastalığın patolojik bulgularını moleküler düzeyde yansıtan, motor belirtilerin yanısıra motor dışı belirtilerin de gözlenebildiği bir model oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla; substansiya nigra, dentat girus ve bu yapıların projeksiyon bölgelerinde, alfa-sinükleinin AAV aracılı ifadesi gerçekleştirilmiş, alfa-sinüklein ifadesinin motor ve bilişsel fonksiyonlara etkisi çeşitli motor testler ve davranış deneyleriyle değerlendirilmiş, patolojik değişiklikler hücresel düzeyde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Epidemiyoloji

Parkinson hastalığına ait karakteristik bulgular ilk defa 1817'de, James Parkinson tarafından tanımlanmıştır. James Parkinson yayımladığı monografında tremor, rijidite ve postural instabilite gibi motor bozuklukların yanısıra uyku ve gastrointestinal sistemle ilgili ilişkili motor dışı bulgulara da değinmiştir (15). Daha sonraki yıllarda; hastalığın SN patolojisi ve Lewy cisimcikleri olarak adlandırılan intranöronal inklüzyon cisimcikleri ile ilişki olabileceği öne sürülmüş (16,17), dopaminin sadece noradrenalin prekürsörü olarak işlev görmediği, tek başına bir nörotransmitter olduğu, Parkinson hastalarının striatumunda dopaminin dramatik bir şekilde azaldığı (16,18). Ayrıca dopaminin SNc'de yoğun olarak bulunduğu ve buradaki nöronların aksonlarının striatuma projekte olduğu gösterilmiştir (16). 1997'de Lewy cisimciklerinde alfa-sinüklein varlığının gösterilmesi (1) ve alfa-sinüklein proteinini kodlayan gendeki mutasyonların (2) PH ile ilişkili olduğunun keşfedilmesiyle bu proteinin hastalığın patolojisinde rolü olduğu bildirilmiştir.

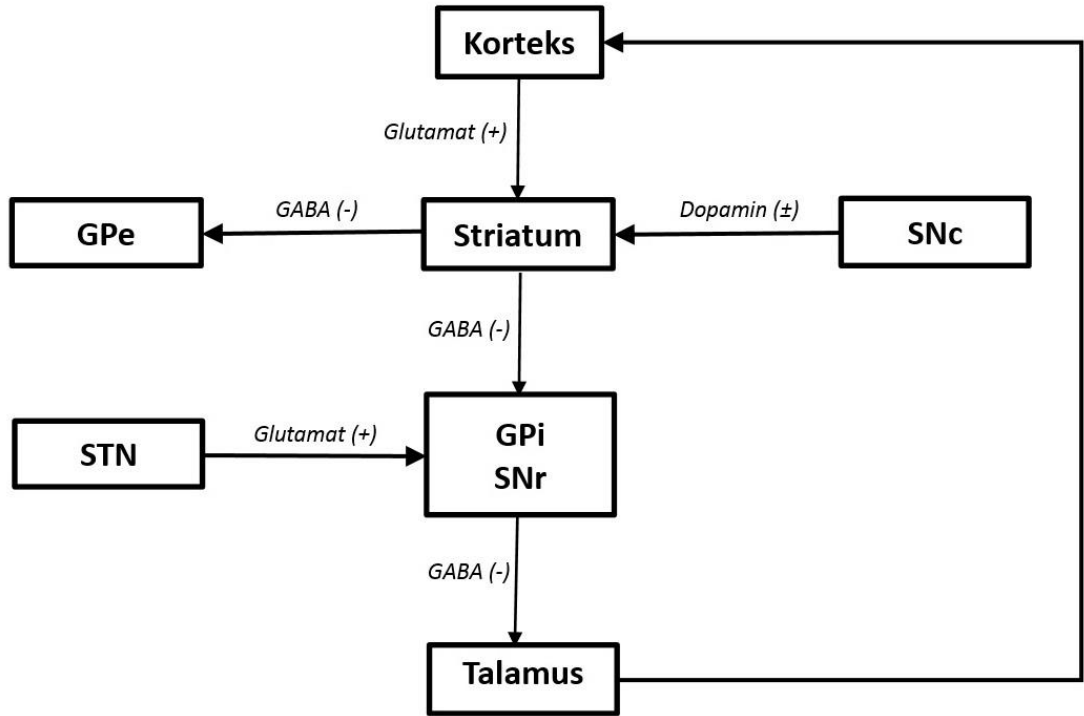
Klinik olarak tanımlanmasından bu yana geçen 200 yılda, PH'nin etyopatogenezine ilişkin elde edilen önemli bilgi birikimine rağmen hastalığın patolojisi ve altta yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Hastalığın genel prevalansı % 0,1-0,2 civarındadır ve bu oran 60 yaş üstünde %1'e, 80 yaş üstünde %4'e kadar ulaşmaktadır (13,19). Olguların çoğu 65-70 yaşları arasında, idiyopatik başlangıçlı olup kalıtsal formları tüm olguların %5-10'u kadarını oluşturur ve daha erken yaşlarda görülebilir (19). Mevcut tedavi yöntemleri hastalığın semptomlarını gidermeye yöneliktir ve hastalığın ilerleyici seyrini engelleyecek, ayrıca hastaların yaşam kalitesini artıracak yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

2.2. Bazal Gangliyonlar

Bazal gangliyonlar ön ve orta beyinde yerleşmiş, birbiriyle yoğun bağlantıları bulunan 4 adet çekirdekten oluşur. Bazal gangliyonları oluşturan ana çekirdekler; striatum, globus pallidus (GP), subtalamik çekirdek (STN) ve substansiya nigradır (SN).

Striatum; putamen, kaudat nükleus ve ventral striatum olmak üzere üç altyapıya ayrılır. GP; globus pallidus interna (GPi) ve globus pallidus eksterna (GPe) olarak adlandırılan iki ayrı kısımdan oluşur. SN; fonksiyonel ve morfolojik açıdan farklılıklar gösteren substansiya nigra pars kompakta (SNc) ve substansiya nigra pars retikülata (SNr) yapılarından meydana gelir. Bazal gangliyon yapıları arasındaki bağlantıyı sağlayan, striatum, GP ve SNr'den projekte olan nöronlar inhibitör GABAerjik, STN'den projekte olan nöronlar ise eksitator glutamaterjiktir (Şekil 2.1).

Bazal gangliyonlar serebral korteks başta olmak üzere talamus, beyin sapı, raphe nucleus, locus coeruleus gibi çeşitli yapılardan girdiler alırlar. Girdilerin alındığı ana yapı striatumdur ve kortikostriatal yolağı oluşturan nöronlar eksitator glutamaterjiktir. Striatum ayrıca SNc'den eksitator dopaminerjik girdiler alır (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Bazal gangliyonların temel döngüsü. SNc: Substansiya nigra pars kompakta, SNr: Substansiya nigra pars retikülata, GPi: Globus pallidus interna, GPe: Globus pallidus eksterna, STN: Subtalamik çekirdek.

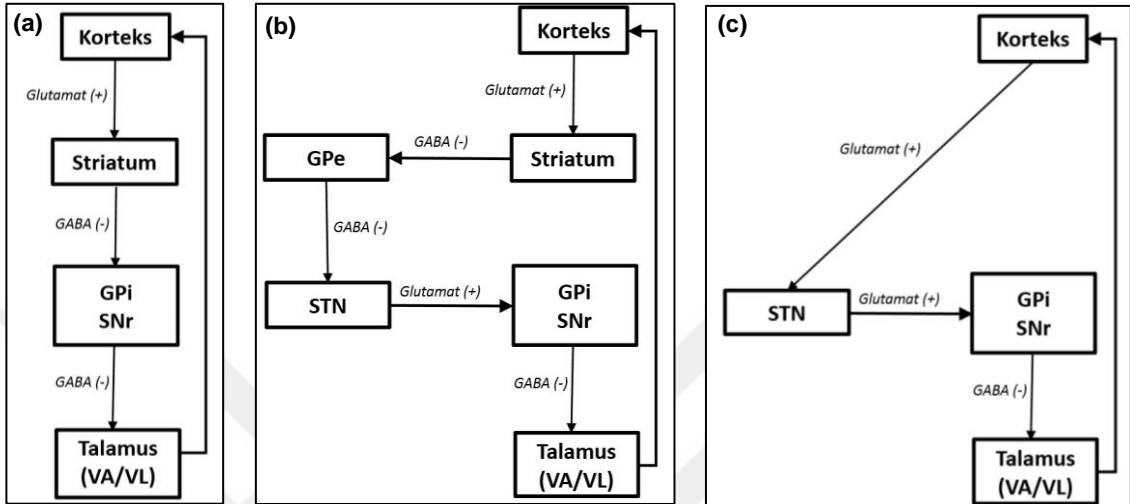
Striatuma gelen girdiler buradan ana çıktı çekirdekleri olan GPi ve SNr'ye uzanır. GPi/SNr'den projekte olan nöronlar talamus üzerinden kortekse, döngünün başladığı yere döner. Nöronların, korteksin çeşitli bölgelerinden başlayarak

striatumun farklı bölgelerine projekte olduğu gösterilmiş, bazal gangliyonlar ve korteks arasındaki bağlantıların işlevsel farklılıkları olan açık ve kapalı devreler ile sağlandığı öne sürülmüştür (20). Bu şekilde tanımlanmış 5 adet kapalı devre vardır (21). Motor bozukluklarda öne çıkan devre motor döngüdür (22). Bu devrede primer motor korteks ve premotor alanlardan projekte olan nöronlar striatumun putamen kısmına gelir (21). Okülomotor, dorsolateral prefrontal ve lateral orbitofrontal devreler korteksin ilgili bölgelerinden başlayarak striatumda, kaudat nükleusun farklı alanlarına projekte olur. Son olarak, limbik döngü, anterior singulat korteksten ventral striatuma uzanır. Prefrontal ve limbik döngülerin farklı bölgelerdeki beyin yapıları ile afferent ve efferent bağlantıları da vardır. Bu döngülerin ve bağlantıların PH'de görülen bilişsel gerileme ve nöropsikiyatrik rahatsızlıklar gibi motor dışı bozukluklarda rol aldığı düşünülmektedir (20,21).

Striatumdaki nöronların %90-95'ini GABAerjik nöronlar oluşturur. Dendritleri üzerinde birçok dikensi çıkıntı bulunur ve *spiny projection neurons* (SPN) olarak adlandırılırlar. SPN'ler hareket esnasında ateşleme yaparlar, fazik olarak aktiftirler. SN, GPe ve GPi'deki GABAerjik nöronlar ise tonik olarak aktiftirler. Striatumda ayrıca tonik aktivite gösteren inhibitör ara nöronlar bulunur. İnhibitör ara nöronlar kolinerjik nöronlar ve GABAerjik nöronlar şeklinde ikiye ayrılabilir. SPN'ler diğer bazal ganliyon yapılarını inerve ederken, inhibitör ara nöronlar sadece SPN'lerin hareket esnasındaki aktivitesinin sınırlandırılmasından sorumludurlar.

Striatumdan projekte olan SPN'ler direkt ve indirekt olmak üzere iki farklı yolak kullanabilirler (Şekil 2.2). Direkt yolakta striatuma gelen uyarı SPN'ler aracılığıyla önce GPi/SNr'ye oradan ventroanterior (VA) ve ventrolateral (VL) talamusa iletilir (Şekil 2.2 (a)). İndirekt yolakta ise striatuma gelen uyarı önce GPe'ye, oradan STN'ye, buradan sonra, direkt yolakta olduğu gibi, GPi/SNp ve son olarak VA/VL talamus'a iletilir (Şekil 2.2 (b)). Direkt yolakta striatuma gelen uyarı ile GPi/SNr inhibe edildiği için net etki; talamusun disinhibisyonu, dolayısıyla talamo-kortikal aktivitenin artışı, indirekt yolakta ise GPi/SNr aktivasyonu ile talamusun inhibisyonu, korteks aktivitesinin azalması şeklindedir. Motor kontrole aracılık eden major yollar olan direkt ve indirekt yolağın yanısıra, üçüncü bir yolak olan, hiperdirekt yolağın da motor

kontrolde rolü olduğu öne sürülmüştür (23). Hiperdirekt yolakta; motor korteksten direkt olarak STN'ye buradan da GPi/SNr'ye eksitator glutamaterjik uyarılar iletilir. Hiperdirekt yolağın aktivasyonu ile görülen net etki; GPi/SNr'nin uyarılması, buna bağlı olarak talamo-kortikal aktivitenin inhibisyonudur



Şekil 2.2. (a) Direkt yolak. (b) İndirekt yolak. (c) Hiperdirekt yolak. SNr: Substansiya nigra pars retikülata, GPi: Globus pallidus interna, GPe: Globus pallidus eksterna, STN: Subtalamik çekirdek VA: Ventroanterior, VL: Ventrolateral.

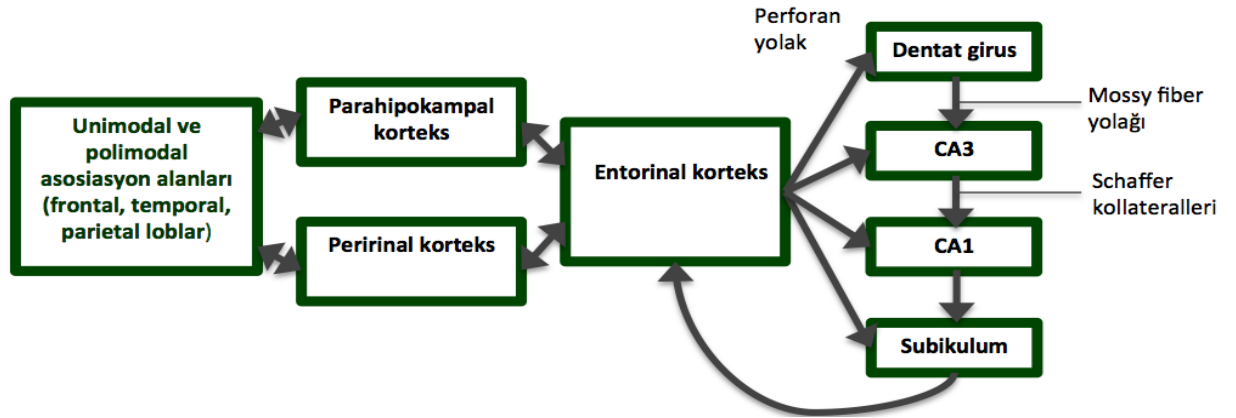
Direkt ve indirekt yolakta eksprese edilen dopamin reseptörleri de farklılık gösterir. Direkt yolakta çoğunlukla eksitator D1 reseptörleri bulunurken, indirekt yolakta inhibitör D2 reseptörleri bulunur. SNc'den striatuma projekte olan dopaminerjik nöronlardan salıverilen dopamin, D1 reseptörleri aracılığıyla direkt yolakta transmisyonu artırırken, indirekt yolakta D2 reseptörleri aracılığıyla transmisyonu azaltır. Böylece talamus üzerindeki tonik inhibisyon azalır, korteks uyarılır.

Çoğunlukla kabul gören klasik modele göre; direkt ve indirekt yollar Gpi üzerinde zıt etkiler gösteren, ayrı sistemlerdir (24). Normal motor hareket direkt ve indirekt yollar arasındaki dengeye dayanır ve Parkinson hastalığında indirekt yolağın aşırı aktivitesi söz konusudur. Dopamin depleasyonu ve akinezi/bradikinezi arasındaki ilişki direkt yolaktaki aktivitenin azalması, indirekt yolaktaki aktivitenin artması ile açıklanır. Bununla birlikte direkt ve indirekt yolların birbirleriyle fonksiyonel ve yapısal olarak bağlantılı olduğu, belirli bir hareket paterninin

başlatılmasında ve devam ettirilmesinde bu iki yolağın koordineli aktivasyonunun gerektiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (25). Önerilen bu modellerde belirli bir motor paternin gerçekleşmesi için direkt yolağın, diğer istenmeyen paternlerin baskılanması için indirekt yolağın aktivasyonu gereklidir (24,26).

2.3. Hipokampus

Hipokampus ve diğer hipokampal yapılar, beynin medial temporal lobunda yerleşmişlerdir. Hipokampus; *cornu ammonis* (CA) ve DG yapılarından meydana gelir. Hipokampusün CA bölgesi; histolojik farklılıklar gösteren, CA1, CA2 ve CA3 alt bölgelerine ayrılır (27). CA, DG ve subikulum hipokampal formasyonu oluşturur. Entorinal, peririnal ve parahipokampal korteksler hipokampal formasyonu çevreler. Hipokampal formasyonun girdilerini aldığı ve çıktılarını gönderdiği ana yapı entorinal korteks (EC)'tir. EC'den DG, CA3, CA1 ve subikuluma projekte olan nöronlar perforan yolağı oluşturur (28) (Şekil 2.3). Hipokampal formasyonu oluşturan yapılar arasındaki majör bağlantılar, çoğunlukla, seri ve tek yönlüdür (27) (Şekil 2.3). Bu bağlantılardan; *Mossy fiber* yolağı DG'den başlayarak CA3'te, *Schaffer* kollateral yolağı CA3'ten başlayarak CA1'de sonlanır. CA1'den projekte olan nöronlar subikuluma, subikulum projeksiyonları ise EC'ye gelir. EC'nin, peririnal ve parahipokampal neokortikal kortekslerle de yoğun bağlantıları bulunur ve bu bağlantılar resiprokaldir (29) (Şekil 2.3). Peririnal ve parahipokampal korteksler unimodal ve polimodal asosiyasyon alanlarından girdiler alıp çıktılar gönderirler (30). Korteksin çeşitli bölgelerinden gelen uyarılar peririnal ve parahipokampal korteksler aracılığı ile EC'ye, oradan da hipokampuse iletilir. Hipokampustan EC'ye gönderilen çıktılar da, aynı şekilde, kortekse ulaştırılır.



Şekil 2.3. Hipokampal formasyonun bağlantıları

Hipokampus ve diğer hipokampal yapıların başlıca fonksiyonları öğrenme, bellek ve uzaysal oryantasyonla ilişkilidir. Öğrenme süreci; bilginin kısa dönem belleğe kaydedilmesi ile başlar. Kısa dönem belleğin kapasitesi sınırlıdır ve kaydedilen bilgi kısa bir zaman periyodu boyunca saklanabilir. Bilginin kalıcı hale getirilmesi için uzun dönem belleğe işlenmeleri gerekir. Teorik olarak, uzun dönem belleğin kapasitesi sınırsız olup öğrenilen bilgiler süresiz olarak saklanabilir. Uzun dönem bellek, öğrenilen bilginin türüne göre; non-deklaratif ve deklaratif olmak üzere ikiye ayrılır. Non-deklaratif bellek, motor becerilerin ve alışkanlıkların öğrenilmesi ile ilişkilidir. Non-deklaratif öğrenme; şartlandırma, habituasyon, sensitizasyon ve prosedürel öğrenme gibi doğrudan bilinç gerektirmeyen yöntemler aracılığıyla gerçekleşir. Serebellum, amigdala, neokorteks ve striatumun non-deklaratif bellekle ilişkili olduğu bilinmektedir. Deklaratif bellek, bilinçli öğrenme ve algılama gerektirir. Olayların ve gerçeklerin hatırlanması ile ilgili olarak sırasıyla; epizodik bellek ve semantik bellek olmak üzere ikiye ayrılır (31). Hipokampusün bellek süreçlerindeki rolüne dair önerilen teoriler farklılık gösterse de (32,33) hipokampus ve diğer medial temporal lob yapılarının deklaratif bellekle ilişkili majör yapılar olduğu bilinmektedir (34).

Hipokampusün uzaysal bellekte spesifik bir rolü olduğu düşünülmektedir. Preklinik ve klinik çalışmalarda, hipokampal lezyonların uzaysal oryantasyonu bozduğu gösterilmiştir (35,36). Hipokampuste uzaysal bilgiyi kodlayan yer hücrelerinin keşfi (37) ve hipokampal lezyonların uzaysal oryantasyon üzerindeki etkilerinden yola çıkılarak bilişsel harita teorisi öne sürülmüştür (38). Bu teoriye göre hipokampus, çevrenin beyindeki temsilini oluşturan zihinsel haritaların ve uzaysal

belleğin oluşturulmasından sorumludur. Daha sonraki yıllarda, EC ve subikulum gibi hipokampal yapılarda yerleşen *grid*, *border* ve *head-direction* hücrelerinin varlığı gösterilmiştir (33,39). Fonksiyonel olarak özelleşmiş bu hücrelerin uzaysal navigasyondaki rolü bilişsel harita teorisini destekler. Hipokampusün, hayvanlarda birincil olarak uzaysal bellek ile ilişkili olduğu, insanlarda ise öğrenme ve belleğin diğer türlerini de içeren, daha kapsamlı bir rolü olduğu düşünülmektedir (40). Mevcut veriler, insanlarda, sağ hipokampusün uzaysal bilginin işlenmesinde, sol hipokampusün ise episodik belleğin oluşturulmasında daha aktif rol aldığını gösterir (33,40).

2.4. Alfa-sinüklein

Alfa-sinüklein ilk olarak, 1988 yılında, *Torpedo californica*'dan izole edilmiş, proteinin presinaptik terminaller ve hücre çekirdeği etrafında yerleşim gösterdiği bildirilmiştir (41). Keşfinden kısa süre sonra, alfa-sinükleinin, Alzheimer hastalığında (AH) görülen amiloid plakların non-amiloid beta komponentinin (NAC) prekürsörü olduğu gösterilmiştir (42). Alfa-sinükleinin tanımlanmasının ardından proteinin iki farklı izoformu keşfedilmiş, sırasıyla beta- ve gama-sinüklein olarak adlandırılmışlardır (43,44). Alfa-sinüklein genindeki A53T nokta mutasyonunun kalıtsal PH ile ilişkilendirilmesi (2) ve proteinin Lewy cisimciklerinin majör komponenti olduğunun gösterilmesi (1) proteinin PH patolojisindeki önemine dair ilk bulgulardır. Alfa-sinüklein ve PH ilişkisinin keşfinden sonra yapılan çalışmalarda, proteinin yanlış katlanması sonucu oluşan toksik oligomer/fibril türlerinin hastalığın patofizyolojisinde rolü olduğu gösterilmiştir.

2.4.1. Yapı

Alfa-sinüklein 140 aminoasitten oluşan ufak, asidik bir proteindir ($pK_a=4.7$). Çoğunlukla presinaptik terminallerde bulunur. Buradaki alfa-sinükleinin çoğu serbest halde, yaklaşık %15'lik kısmı mebrana bağlı haldedir ve normal koşullarda bu iki fraksiyon arasındaki denge korunur (45).

Alfa-sinüklein aminoasit dizilimi; amino terminali, NAC ve karboksi terminali olmak üzere üç bölgeye ayrılabilir. Amino terminali negatif yüklü fosfolipitlerle etkileşerek membranlara bağlanır (46). NAC bölgesi agregat oluşumu için esansiyeldir ve oldukça hidrofobik olan bu bölge membranlarla da etkileşir. Amino terminali ve NAC bölgelerinde 11 aminoasitlik tamamlanmamış tekrar dizilimleri bulunur. Bu dizilimler sinükleinler arasında oldukça korunmuş olup proteinin alfa-heliks konformasyonu ile ilişkilendirilmiştir (47). Karboksi terminali, büyüklük ve dizilim açısından, türler arasında farklılık gösterir (46), alfa-sinükleinin diğer proteinler ve metallerle etkileşmesine aracılık eder (48).

In vitro deneylerde, alfa-sinükleinin doğal formunun, katlanmamış, stabil monomerler olduğu gösterilmiştir (49–52). Bununla birlikte değişen ortam koşullarının, proteinin yapısal modifikasyonlarının, farklı molekül ve hücre yapıları ile etkileşmenin agregat oluşumunu tetiklediği, bazı durumlarda da engellediği, gözlenmiştir. Yüksek sıcaklık, düşük pH, oksidatif stres artışı, ortamdaki makromoleküllerin artmış konsantrasyonları agregat oluşumunu kolaylaştıran faktörler arasındadır. Molekülün serin-129 rezidüsünün fosforilasyonu, lizin rezidüsünün modifikasyonları, metionin ve tirozin rezidülerinin oksidasyonu, ayrıca dopamin oksidasyon ürünleri ile etkileşimlerinin oligomer/fibril oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (45). Karboksi- terminalinin belirli noktalardan kesilmesi agregat oluşumunu hızlandırır. Proteinin yapısında değişikliklere neden olan A53T, E46K mutasyonları ile fibril, A30P mutasyonu ile oligomer oluşumu gözlenir. Alfa-sinüklein genindeki (SNCA) triplikasyonlar proteinin aşırı ifadesine ve protein agregatlarının oluşumuna neden olur. Ortamda bulunan anyonlar ve/veya metaller, daha spesifik olarak Cu^{2+} ve Fe^{2+} , proteinin kısmi olarak katlanmasına, agregat oluşumunun kolaylaşmasına yol açar. Rotenon ve paraquat gibi çevresel toksinlerin de agregat oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Alfa-sinükleinin membranlara bağlanması protein yapısında değişikliklere, özellikle de alfa-heliks konformasyonu almasına neden olur. Membran fosfolipitleri ile etkileşme sonucu gözlenen yapısal değişikliklerin agregat oluşumunu hızlandırdığı ya da engellediğine dair farklı bulgular mevcuttur (45,53). Bu bulgulara göre alfa-sinüklein normal koşullarda katlanmamış

monomerler olarak bulunur, ancak değişen ortam koşulları ve moleküler düzeydeki etkileşimleri proteinin kısmi olarak katlanmasına, sonuç olarak oligomer ve/veya fibril oluşumuna yatkın hale gelmesine neden olur.

2.4.2. Fizyolojik İşlevleri

Alfa-sinükleinin fizyolojik işlevleri kesin olarak bilinmemekle beraber, proteinin presinaptik yerleşimi, membran yapıları ve çeşitli sinaptik proteinlerle etkileşimi sinaptik aktivitede rolü olabileceğini düşündürür. Alfa-sinükleinin, sinaptik vezikül rezervlerinin regülasyonu, veziküllerin mobilizasyonu ve nörotransmitter salıverilmesi ile ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (54–58). Mevcut verilerle alfa-sinükleinin sinapslardaki işlevi kesin olarak tanımlanamasa da, proteinin sinaptik transmisyonun regülasyonunda rolü olduğu açıktır (59). Alfa-sinükleinin, spesifik olarak dopaminerjik sinapslardaki etkileri dopaminin, sentez, salıverilme, geri alım ve depolama aşamalarında görülür. Alfa-sinüklein, tirozin hidroksilaz (TH) ve amino asit dekarboksilaz (AADC) enzim aktivitelerini inhibe ederek dopamin sentezini negatif yönde etkiler (60,61). Proteinin aşırı ifadesinin *in vitro* ve *in vivo* olarak dopaminerjik salıverilmeyi azalttığı (62,63), *knock-out* (KO) edilmesinin ise, fare modellerinde, dopamin salıverilmesini artırdığı gözlenmiştir (64). Alfa-sinükleinin, ayrıca, dopamin taşıyıcısının (DAT) ve veziküler dopamin taşıyıcısının (VMAT2) ifadesini ve aktivitelerini değiştirdiği gösterilmiştir (65).

Alfa-sinükleinin sinaptik terminallerden başka, nükleus ve mitokondride de gözlenmesi patolojik koşullara bağlı olarak ortaya çıkabileceği gibi, proteinin bu yapılarda fizyolojik olarak da fonksiyon gösterebileceğine işaret eder. Alfa-sinükleinin hücre nükleusunda histonlar, transkripsiyon faktörleri gibi nükleer proteinler ve çeşitli *promoterlar* ile etkileşerek gen ekspresyonunu modüle edebileceği öne sürülmüştür (66). Alfa-sinüklein miktarındaki değişikliklerin mitokondri morfolojisini ve işlevlerini etkilediği gösterilmiş (67), proteinin, normal koşullarda, mitokondrinin işlevselliğinin sürdürülmesinde katkısı olduğu öne sürülmüştür (59).

Alfa-sinükleinin, karboksi terminali aracılığıyla çeşitli protein ve moleküllerle etkileşebilmesi, aynı zamanda şaperon protein 14-3-3 ile yapısal ve fonksiyonel

homoloji göstermesi nedeniyle şaperon benzeri aktivite gösterebileceği öne sürülmüştür (46). Alfa-sinükleinin, yüksek sıcaklıkta denatüre olan proteinlerin agregasyonunu önlediği, oksidatif stres ve apoptotik uyarılara karşı dopaminerjik nöronları koruduğu bildirilmiştir (65). Benzer olarak, artmış oksidatif stres koşullarında alfa-sinüklein ifadesinin arttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği (68), proteinin monomerik formunun membranların doymamış yağ asitlerine bağlanarak lipit oksidasyonunu önlediği (69) bildirilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, alfa-sinükleinin antioksidan işlevlerinin de olduğu düşünülmektedir.

2.4.3 Alfa-sinüklein ve PH Patolojisi

Parkinson hastalığında görülen temel patolojik bulgu; SNC'deki dopaminerjik nöronların dejenerasyonu, buna bağlı olarak da striatal dopamin miktarının azalmasıdır. Nörodejenerasyonun yanı sıra, nöronlarda alfa-sinüklein içeren LC'lerin bulunması da PH'nın karakteristik bir göstergesidir. Nörodejenerasyonu başlatan asıl olay bilinmemekle beraber, genetik ve çevresel faktörlerin buradaki nöronların ölümüne yol açtığı, SN dopaminerjik nöronların fizyolojik karakteristiklerinin bu süreci kolaylaştırdığı bilinmektedir. PH'de, patolojik alfa-sinüklein birikiminin dışında; hücre içi yıkım yollarının disfonksiyonu, mitokondriyal işlev bozuklukları, oksidatif ve nitrozatif stres, nöroinflamasyon, Ca^{2+} disregülasyonu ve eksitotoksitenin de nörodejeneratif sürece katkısı olduğu bilinmektedir (13,70–73). Bu olaylar, alfa-sinüklein patolojisi ve birbirleriyle yakından ilişkili olup nörodejeneratif süreçte değişen oran ve derecelerde rol alırlar (74).

Alfa-sinükleinin PH patogeneziindeki önemine dair ilk bulgular; SNCA genindeki A53T nokta mutasyonunun kalıtsal PH ile ilişkilendirilmesi (2) ve proteinin Lewy cisimciklerinin majör komponenti olduğunun gösterilmesidir (1).

Oligomer ve/veya fibril oluşumu hastalığın en önemli karakteristik bulgularından bir tanesidir. Alfa-sinüklein monomerlerinin ortam koşullarına ve moleküler etkileşimlerine bağlı olarak yanlış katlanması oligomerlerin oluşumuna yol açar. Oligomerlere daha fazla monomer eklenmesi amiloid fibrillerin, bu fibrillerin patolojik düzeylerde birikmesi de Lewy cisimciklerinin oluşumu ile sonuçlanır.

Oligomerik agregatlar daha çok aksonlarda ve presinaptik terminallerde gözlenirken, fibriler alfa-sinüklein Lewy cisimciklerinin içinde, nöron gövdelerinde yerleşim gösterir (48). Alfa-sinüklein fibrilleri beta tabakalar açısından zengin olup, farklı yapılarda bulunabilir (75,76). Yapısal farklılıkların, beta tabakaların katlanma şekillerinden ve/veya yan zincirlerin bulunduğu ortamla etkileşmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (45). Fibrillere benzer şekilde, oligomerler de yapısal farklılıklar gösterir. Alfa-helikol, beta-tabakalı ya da düzensiz yapılarda oligomerler mevcuttur (77). Alfa-sinüklein, dinamik yapısı nedeniyle, farklı hücre yapılarında farklı konformasyonlarda bulunuyor olabilir. Proteinin, *in vivo* yapısal durumuna ve fizyolojik rolüne ilişkin mevcut verilerin kısıtlı olması PH patofizyolojisine neden olan türlerin kesin olarak belirlenmesini zorlaştırır. Rekombinant alfa-sinüklein fibrillerinin (78,79) ve *post-mortem* beyinlerden elde edilen fibrillerin nörodejenerasyonu ve Lewy benzeri patolojiyi indüklediği (80), selektif nöron ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (81). Bununla birlikte, nöron ölümünün fibril oluşumundan önce (82) veya fibriler inklüzyonlar olmaksızın (75,83) gerçekleştiği, alfa-sinüklein gen mutasyonlarında proteinin fibriler olmayan oligomerik türlerinin varlığı (84,85) bildirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda hastalıktan sorumlu olan alfa-sinüklein formunun toksik oligomerler olduğu ileri sürülmüştür.

Oligomerik ve fibriler alfa-sinüklein türleri ve nörodejenerasyon arasındaki ilişki bu türlerin önemli hücrel mekanizmaların normal işleyişini bozmasıyla açıklanabilir. Oligomerik/fibriler alfa-sinüklein türlerinin lipit membranlar, mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği gibi hücrel yapılarla, glial hücrelerle, aksonal transportta rol alan proteinlerle, ayrıca protein degradasyon sistemleri olan ubiquitin proteaz sistemi ve şaperon aracılı otofaji ile etkileştiği gösterilmiştir (86). Bununla birlikte, alfa-sinükleinin olası fizyolojik fonksiyonları gözönüne alınarak, katlanmamış monomerlerinin fonksiyon kaybının da patofizyolojide rolü olabileceği öne sürülmüştür (47).

PH'nin patogenezinde rol aldığı gösterilen moleküler mekanizmalar arasında alfa-sinüklein agregasyonu ve ilişkili olaylar önemli yer tutar. Bununla birlikte hastalığın daha iyi anlaşılabilmesi ve etkili tedavi yöntemleri geliştirilebilmesi için;

alfa-sinükleinin fizyolojik ve patolojik koşullardaki işlevlerinin, hücrel yerleşiminin, ayrıca toksisiteye neden olan türlerinin ve bu türlerin oluşmasına katkıda bulunan faktörlerin aydınlatılması gerekmektedir.

PH nigral dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize edilmesine rağmen patolojinin buradaki nöronlarda başlamadığı ve bazal gangliyonlar dışında diğer yapıları da etkilediği ileri sürülmüştür (12,87). Braak hipotezine göre patofizyoloji 6 aşamaya ayrılır ve klinik bulgular son 3 aşamada görülür. Braak aşamalandırmasının çıkış noktası; post mortem dokularda, alfa-sinüklein içeren Lewy cisimciklerinin ve Lewy nöritlerin (LN), hastalığın evresine göre farklı yapılarda gözlenmesidir (12). Birinci aşamada; vagus sinirinin dorsal motor nükleusunda ve olfaktor bulbusta LC ve LN'ler görülür. İkinci aşamada locus coeruleus, raphe nucleus ve retiküler sistem, üçüncü aşamada; bazal ön beyin, amigdala, SNc yapıları etkilenir. Daha sonra patoloji mezokortekse ilerler ve bu aşama dördüncü aşama olarak kabul edilir. Beşinci ve altıncı aşamalarda ise LC/LN patolojisi; preferontal, duyuasal asosiyasyon ve premotor alanları da kapsamak üzere neokortekse yayılır. LC/LN patolojisi görülen nöronların uzun, ince aksonlu, aksonların myelinsiz veya kısmen myelinli olduğu da gözlenmiştir (12). Bu bulgular patolojinin hasara yatkın olan nöronlarda rostral olarak ilerlediği tezini güçlendirir. PH'de, enterik sinir sisteminin de (ESS) LC/LN patolojisinden etkilendiği gösterilmiştir (88). Hastalığın erken evrelerinden itibaren görülen gastrointestinal belirtiler, ayrıca ESS nöronlarının morfolojik yapıları göz önüne alınarak patolojinin ESS'de başlayıp vagus siniri aracılığı ile santral sinir sistemine (SSS) geçiş yaptığı öne sürülmüştür (12,88). Bu modellerde alfa-sinükleinin nöronlar arası transmisyonunun prion benzeri mekanizmalarla gerçekleştiği düşünülmektedir. Fötal dopaminerjik nöron transplantasyonu yapılan Parkinson hastalarında, transplantların alfa-sinüklein inklüzyonları içerdiği bildirilmiştir (89,90). Bu bulguları takiben yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerle de alfa-sinüklein patolojisinin transsinaptik olarak yayılabileceği gösterilmiştir (91,92).

PH patolojisinin, Braak aşamalandırmasına göre, belli bir patern izleyerek ilerlediği ve nöronlar arası prion benzeri mekanizmalarla geçiş yaptığı gösterilse de bu hipotez halen tartışmalıdır. Patolojinin başlangıç noktası, etkilenen yapılar ve

hastalığın şiddeti arasındaki ilişki, retrograd yayılım gibi noktalarda Braak hipotezinden farklılık gösteren olguların varlığı nedeniyle hastalığın sadece belirli bir alt tipinin Braak hipotezi ile uyumlu olarak ilerleyebileceği öne sürülmüştür (91).

2.5. Motor ve Motor Dışı Belirtiler

PH'de görülen temel motor belirtiler bazal ganglia yapılarının disfonksiyonu ile açıklanabilir (13). Klinikte, striatal dopaminin %80 azalması, deneysel modellerde nigral dopaminerjik hücre kaybının %50-60 civarında olması motor belirtilerin görülmesi için eşik değerlerdir (11,93). Braak hipotezine göre, motor bozukluklar 3. aşamadan itibaren görülür. LC patolojisi bu evrede orta beyine ulaşır ve SNc dahil olmak üzere buradaki yapıları etkiler (87).

Hastalığın motor dışı bulguları; kognitif ve nöropsikiyatrik belirtiler, uyku bozuklukları, otonomik ve duysal belirtileri kapsar (94). Bu bulguların bir kısmı hastalığın erken evrelerinde, motor belirtilerden önce görülebileceği gibi, hastalığın ilerleyen evrelerinde de motor bozukluklara eşlik edebilir. Hastaların yaşam kalitesini en az motor bozukluklar kadar etkileyen motor dışı bulgulardan bilişsel disfonksiyon, anksiyete ve depresyon oldukça yaygındır ve ortalama prevalansları %40 ila 50 arasındadır (95).

Frontostriatal devrelerin işleyişindeki bozukluklar çeşitli nöropsikiyatrik hastalıkların patolojisinde rol oynar (96). Serotonin, noradrenalin, asetilkolin, GABA ve dopamin gibi farklı nörotransmitterlerin frontostriatal devrelerin aktivitesini modüle ettiği bilinmektedir (21). Bu devrelerdeki azalmış dopaminerjik aktivitenin, PH'de görülen bilişsel gerileme, anksiyete ve anhedoniye aracılık ettiği düşünülmektedir (97).

Bilişsel ve nöropsikiyatrik bozuklukların hipokampal yapılar ile de ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (14). Çeşitli görüntüleme teknikleri ile Parkinson hastalarında hipokampal volümün azaldığı gösterilmiş, hipokampal atrofinin kognitif disfonksiyonla ilişkili olduğu gözlenmiştir (98–101). Hipokampusün öğrenme ve bellekteki rolü, moleküler düzeyde, buradaki nöronlarda gerçekleşen sinaptik plastisite ve uzun dönemli potansiyalizasyon (LTP) ile açıklanır (102,103). Toksin

aracılı ve genetik hayvan modellerinde; LTP'nin, endojen dopamin miktarı ve kognitif fonksiyonlarla beraber korele bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (104). Dopaminerjik hipoaktivitenin yanısıra alfa-sinüklein patolojisinin de hipokampal fonksiyonları etkilemesi olasıdır. Hastalığın ilerleyen evrelerinde, hipokampus ve diğer limbik sistem yapılarında LC'lerin varlığı bildirilmiştir (87). Alfa-sinüklein agregasyonunun LTP üzerindeki rolü incelendiğinde; alfa-sinüklein oligomerlerinin bazal sinaptik transmisyonu değiştirdiği ve LTP'yi azalttığı gözlenmiştir (105).

Hipokampus DG ve subventriküler bölge, yetişkin beyinde, yeni nöron oluşumunun gözlendiği bölgelerdir (106). PH patolojisinin bu yapılarıdaki nörogenezi azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (107). Hipokampal nörogenezin, öğrenme ve bellek fonksiyonlarının yanısıra, nöropsikiyatrik hastalıklarda da rolü olduğu düşünülmektedir (106). Hipokampusun ventral tegmental alan (VTA) ve nükleus akumbens (NAc) gibi mezolimbik yapılarla olan anatomik bağlantıları ve mezolimbik sistemin nöropsikiyatrik hastalıklardaki rolü gözönüne alınarak PH'de görülen depresyon, anksiyete ve anhedoninin hipokampal disfonksiyon ile ilişkili olabileceği önerilmiştir (14,106).

2.6. Deneysel Hayvan Modelleri

Deneysel PH modelleri, genel olarak, toksin aracılı ve genetik modeller olmak üzere ikiye ayrılabilir. Halen kullanılmakta olan deneysel modellerin hastalığın etiolojisinin ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına katkısı büyük olmakla beraber, bu modellerden hiçbiri hastalığın patofizyolojisini ve ilerleyici nörodejeneratif süreci tam olarak yansıtmamaktadır.

2.6.1. Toksin aracılı modeller

Toksin aracılı modellerde; 6-OHDA, MPTP, paraquat ve rotenon gibi nörotoksinler kullanılarak akut nöron harabiyeti gerçekleştirilir. Bu modeller, nigrostriatal hasarın oluşturmasında etkili olmakla beraber hastalığın ilerleyici sürecini yansıtmakta yetersizdirler .

6-Hidroksidopamin (6-OHDA)

6-OHDA mitokondriyal kompleks I'i inhibe ederek oksidatif stres artışına ve enerji üretiminin azalmasına neden olur. PH'dekine benzer şekilde, nigrostriatal dopaminerjik nöron hasarı ve dopamin deplesyonu görülür (108). 6-OHDA'nın alfa-sinüklein ile etkileştiği gösterilmiş olsa bile, bu modelde, PH'de karakteristik olarak görülen protein agregatları ve/veya Lewy benzeri cisimciklere rastlanmaz (109).

MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin)

MPTP, sistemik enjeksiyonu takiben kan beyin bariyerini geçerek astrositlere alınır. Burada, toksik etkilerden asıl sorumlu olan, MPP⁺'ye (1- metil-4-fenilpiridinyum) dönüşür ve MPP⁺ dopamin taşıyıcıları (DAT) ile nöronlara transfer edilir. Güçlü bir mitokondriyal kompleks I inhibitörü olan MPP⁺ 'nin oksidatif stresi artırdığı, hücrenin enerji metabolizmasını bozduğu, inflamasyon ve apoptozis yollarını aktive ettiği bildirilmiştir (109,110). MPTP, kullanıldığı modellerde, PH'dekine benzer şekilde, selektif olarak, SNc dopaminerjik nöronların ölümüne ve dopamin miktarının azalmasına neden olur. Motor bozukluklar primatlarda açık bir şekilde gözlenirken, farelerde türlere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir. MPTP modellerinde genellikle LC'lere rastlanmaz. Birkaç çalışmada MPTP ile Lewy benzeri inklüzyonların oluştuğu bildirilmiştir ancak bu durumun tekrarlanabilirliği düşüktür ve uygun koşullar sağlandığı takdirde LC oluşumunun gözlenebileceği öne sürülmüştür (111).

Paraquat

Paraquat yapıca MPP⁺'ye benzerlik gösteren bir herbisittir toksik etkilerini oksidatif stresi artırarak gösterir. Artmış reaktif oksijen türleri, daha spesifik olarak O₂⁻, H₂O₂ ve OH⁻ lipid, protein, DNA ve RNA hasarına neden olur (109). Paraquat, MPP⁺'ye göre daha zayıf bir mitokondriyal kompleks I inhibitörüdür ve oksidatif stresi, asıl olarak, hücre içi redoks döngüleri ile etkileşerek artırır (112). Ayrıca proapoptotik yolları aktive ederek apoptoze de yola açtığı gösterilmiştir (110). Ancak nigrostriatal sistem üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Paraquat uygulamasını takiben nigrostriatal yolda nörodejenerasyon görüldüğünü bildiren çalışmaların yanısıra herhangi bir değişikliğin gözlenmediği çalışmalar da mevcuttur (109). Paraquat modelinin sağladığı en büyük avantaj alfa-sinüklein agregatlarına ve Lewy benzeri cisimciklerin oluşumuna yol açmasıdır (113).

Rotenon

Rotenon herbisit ve insektisit olarak kullanılan toksik bir ajandır. Oldukça lipofilik olup farklı yollardan uygulanabilir. Hayvan modellerinde, alfa-sinüklein agregasyonu, LC oluşumu, mitokondriyal kompleks I inhibisyonu, oksidatif stres, inflamasyon, davranışsal değişiklikler ve gastrointestinal bozukluklar gibi PH'ye özgü birçok karakteristik bulgu gösterilmiştir (114). Rotenon ile belirli dozlarda selektif nigrostriatal nörodejenerasyon gerçekleştirilebildiği bildirilmişse de lezyonun büyüklüğü ve yerleşimi ile ilgili birbiri ile uyum göstermeyen, farklı sonuçlar mevcuttur (115,116).

Tablo 2.1. Toksin aracılı modellerin karşılaştırılması (117).

Model	Motor bozukluk	SNc nöronlarının kaybı	Striatal dopamin kaybı	LC/Sinüklein patolojisi
6-OHDA	Azalmış lokomotor aktivite, tek taraflı dönme hareketi	+++	+++	Yok

Tablo 2.1. Toksin aracılı modellerin karşılaştırılması (devam) (117).

MPTP	Bradikinezi, tremor, rijidite, azalmış lokomotor aktivite	+++	+++	Yok
Rotenon	Azalmış lokomotor aktivite	++	+++	Var
Paraquat	Azalmış lokomotor aktivite	++	+++	Var

+++ : Şiddetli, ++ : Orta, + : Hafif

2.6.2. Genetik Modeller

Genetik geçişli PH tüm olguların %10 kadarını oluşturur (118). Nadir olarak görülmesine rağmen, sporadik PH'dekine benzer klinik bulguların gözlenmesi nedeniyle altta yatan mekanizmaların da benzer olabileceği ileri sürülmüştür. Bu modellerde, PH ile ilişkili olduğu bilinen gen ve gen ürünlerinin modifikasyonları söz konusudur.

Alfa-sinüklein

PH'ye ilişkin ilk genetik bulgu alfa-sinüklein geninde (*SNCA*) meydana gelen mutasyonlardır. Kalıtsal PH'de, *SNCA* nokta mutasyonlarının (A53T, A30P, E46K ve H50Q) ve multiplikasyonlarının varlığı gösterilmiştir (2–5,119). *SNCA* multiplikasyonları ifade edilen protein seviyelerinin patofizyolojide rolü olabileceğini düşündürür (110). Bu amaçla alfa-sinükleinin mutant ve yabancı formlarının aşırı ifadesine dayanan transgenik ve viral vektör aracılı hayvan modelleri geliştirilmiştir.

Transgenik fare modellerinde; motor bozukluklar, striatumda azalmış dopamin ve TH seviyeleri, buradaki dopaminerjik terminallerinin kaybı, SNc ve diğer beyin bölgelerinde alfa-sinüklein agregatlarının varlığı bildirilmiştir. Kullanılan transgenik fare modeli ve *promoter*'a göre elde edilen bulgular farklılık gösterir (117). Ancak bu modellerin çoğunda PH'dekine benzer, ilerleyici nitelikte ve selektif nigrostriatal dejenerasyon gözlenememiştir (11,110,120).

Viral vektör aracılı modellerde, lentiviral (LV) ya da adeno ilişkili viral (AAV) vektörler kullanılarak, istenilen beyin bölgesinde, alfa-sinükleinin aşırı ifadesi sağlanır. Alfa-sinüklein geninin orta beyin dopaminerjik nöronlara transdüksiyonunda, AAV vektörleri LV vektörlere göre daha etkili bulunmuştur. Gen aktarımı, AAV aracılı modellerde %80 ila 90 arasında iken, LV vektörlerde bu oran %50 civarındadır (11). Buna bağlı olarak, AAV modellerinde gözlenen nigral nöron kaybının ortalama %50-60, LV modellerinde ise %25-35 civarında olduğu bildirilmiştir (121). Transgenik modellerin aksine, viral vektör aracılı modellerde; ilerleyici nitelikte nigral dopaminerjik nöron kaybı, striatal akson ve terminallerin nörodejenarasyonu gözlenmiştir. Nöron kaybı, retrograd yayılım hipotezinde önerildiği gibi, striatal akson ve terminallerin dejenerasyonundan sonra gerçekleşir. Bildirilen sonuçlar değişkenlik gösterse de motor fonksiyonların kaybı söz konusudur (122)

Tablo 2.2. Viral vektör aracılı alfa-sinüklein modelleri (121,123)

Alfa-sinüklein	Vektör	Promoter	Tür	Nigral hücre kaybı (%)	Striatal terminal kaybı (%)	Striatal dopamin kaybı	İnklüzyonlar	Motor belirtiler	Referans
WT	LV	PGK	<i>Rattus norvegicus</i>	35 (5 ay)	16 (5 ay)	-	α -sinüklein (+)	-	(75)
A30P	LV	PGK	<i>Rattus norvegicus</i>	24 (5 ay)	9 (5 ay)	-			
A53T	LV	PGK	<i>Rattus norvegicus</i>	15 (3 hafta) 35 (6 hafta) 33 (5 ay)	22 (5 ay)	-			
WT	LV	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	32 (3 ve 9 hafta)	-	-	-	-	(85)
A53T	LV	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	17 (3 hafta)	-	-	-	-	
A30P	LV	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	38 (3 hafta)	-	-	-	-	
E46K	LV	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	40 (3 hafta)	-	-	-	-	
E57K	LV	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	51 (3 ve 9 hafta)	-	-	-	-	
E35K	LV	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	50 (3 hafta)	-	-	-	-	
WT	LV	EF1a	<i>Rattus norvegicus</i>	35 (9 hafta)	-	-	-	-	

-: Tanımlanmamış, WT: *Wild type* (Yabani tip)

Tablo 2.2. Viral vektör aracılı alfa-sinüklein modelleri (devam) (121,123)

Alfa-sinüklein	Vektör	Promoter	Tür	Nigral hücre kaybı (%)	Striatal terminal kaybı (%)	Striatal dopamin kaybı	inküzyonlar	Motor belirtiler	Referans
WT, A53T	rAAV2/2	CBA	<i>Rattus norvegicus</i>	23 (3 hafta) 30 ve 80 (8 ve 27 hafta)	10 (3 hafta) 50 (8 hafta) 20 (27 hafta)	40 ve 50 (3 ve 27 hafta)	α -sinüklein (+)	Dopaminerjik nöron kaybı %60'tan fazla olan hayvanların %25'inde motor asimetri	(7)
A30P	rAAV2/2	CBA	<i>Rattus norvegicus</i>	53 (52 hafta)	-	-	α -sinüklein (+)	Motor asimetri ve motor koordinasyon bozukluğu	(8)
WT, A30P	LV	CMV	<i>Mus musculus</i>	10 ve 25 (40 ve 52 hafta)	-	-	α -sinüklein (+) ubikitin (+)	-	(124)
WT	rAAV2/2	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	50 (13 hafta)	-	Yok	α -sinüklein (+) pS129 (+)	Amfetaminle indüklenen dönemde artış* *İstatistiksel olarak anlamlı değil.	(125)
WT	rAAV2/5	CBA	<i>Callithrix jacchus</i>	35-40* (12 ay) *8 hayvandan 2 tanesinde	Azalma* *Kantitize edilmemiştir	-	α -sinüklein (+) pS129 (+) ubikitin (+)	Motor asimetri	(9)
A53T	rAAV2/5	CBA	<i>Callithrix jacchus</i>	$\geq 40^*$ (12 ay) *7 hayvandan 6 tanesinde	WT grubuna göre daha fazla azalma* *Kantitize edilmemiştir.	-	α -sinüklein (+) pS129 (+) ubikitin (+) PK (+)	Motor asimetri	

-: Tanımlanmamış, WT: Wild type (Yabani tip)

Tablo 2.2. Viral vektör aracılı alfa-sinüklein modelleri (devam) (121,123)

Alfa-sinüklein	Vektör	Promoter	Tür	Nigral hücre kaybı (%)	Striatal terminal kaybı (%)	Striatal dopamin kaybı	İnklüzyonlar	Motor belirtiler	Referans
WT	rAAV2/2	CBA	<i>Mus musculus</i>	25 (24 hafta)	Yok	-	Yok	-	(10,56)
WT	rAAV2/5	CBA	<i>Rattus norvegicus</i>	56 (26 hafta)	-	68 (26 hafta)	α -sinüklein (+)	-	(126)
WT S129A	rAAV2/5	CBA	<i>Rattus norvegicus</i>	70 ve 80 (4 ve 8 hafta)	-	51 (4 hafta) 63 (8 hafta)			
WT	rAAV2/6	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	22 (8 hafta)	5 (8 hafta)	-	α -sinüklein (+) pS129 (+) PK (+)	-	(127)
WT S129A	rAAV2/6	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	70 (8 hafta)	16 (8 hafta)				
WT S129D	rAAV2/6	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	10 (8 hafta)	Kayıp yok				
A30P	rAAV2/6	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	20 (8 hafta)	3 (8 hafta)				
A30P S129A	rAAV2/6	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	70 (8 hafta)	15 (8 hafta)				
A30P S129D	rAAV2/6	CMV	<i>Rattus norvegicus</i>	Kayıp yok	Kayıp yok				
WT	rAAV2/6	Syn-1	<i>Rattus norvegicus</i>	>70 (8-16 hafta)	60 (8-16 hafta)	60 (8-16 hafta)	α -sinüklein (+) pS129 (+) PK (+)	Motor asimetri	(128)

-: Tanımlanmamış, WT: Wild type (Yabancıl tip)

Tablo 2.2. Viral vektör aracılı alfa-sinüklein modelleri (devam) (121,123)

Alfa-sinüklein	Vektör	Promoter	Tür	Nigral hücre kaybı (%)	Striatal terminal kaybı (%)	Striatal dopamin kaybı	İnklüzyonlar	Motor belirtiler	Referans
WT	rAAV2/5	CBA/CMV hibrid	<i>Rattus norvegicus</i>	60 (8 hafta)	42 (8 hafta)	-	-	Motor asimetri Postural instabilite Somatosensori asimetri gözlenmemiştir (Bilateral <i>tactile stimulation</i>)	(129)
WT	rAAV2/7	CMV/Syn-1	<i>Mus musculus</i>	19, 45, 57 (4 hafta)	17, 56, 73 (4 hafta)	-	α -sinüklein (+) pS129 (+)	Motor asimetri Motor koordinasyon bozukluğu Azalmış lokomotor aktivite	(130)
WT	rAAV2/7	CMV/Syn-1	<i>Mus musculus</i>	23, 50, 82 (8 hafta)	56, 86 (8 hafta)	-			
A53T	rAAV2/7	CMV/Syn-1	<i>Mus musculus</i>	51 (4 hafta)	57 (4 hafta)	-	α -sinüklein (+) pS129 (+)	-	
A53T	rAAV2/7	CMV/Syn-1	<i>Mus musculus</i>	59 (8 hafta)	91 (8 hafta)	-	α -sinüklein (+) pS129 (+)	-	(130)
A53T	rAAV2/7	CMV/Syn-1	<i>Rattus norvegicus</i>	80 (4 hafta)	Azalmış* *Kantitize edilmemiştir	92(4 hafta)	α -sinüklein (+) ubikitin (+)	Motor asimetri Motor koordinasyon bozukluğu Azalmış lokomotor aktivite	(131)

-: Tanımlanmamış, WT: *Wild type* (Yabani tip)

Tablo 2.2. Viral vektör aracılı alfa-sinüklein modelleri (devam) (121,123)

Alfa-sinüklein	Vektör	Promoter	Tür	Nigral hücre kaybı (%)	Striatal terminal kaybı (%)	Striatal dopamin kaybı	İnküzyonlar	Motor belirtiler	Referans
A53T	rAAV2/7	CMV/Syn-1	<i>Rattus norvegicus</i>	80 (16 hafta)	Azalmış	-	α-sinüklein (+) pS129 (+)	Azalmış spontan aktivite Motor asimetri	(132)
			<i>Mus musculus</i>	30 (20 hafta)	Azalmış	-		-	
			<i>Callithrix jacchus</i>	20 (11 hafta)	Azalmış	-		-	

-: Tanımlanmamış, WT: Wild type (Yabani tip)

LRRK2 (Leucine-rich repeated kinase 2)

LRRK2 gen mutasyonları geç başlangıçlı, otozomal dominant PH ile ilişkilendirilmiştir (133). Transgenik hayvan modellerinin birkaçında; zaman içerisinde artan motor bozukluklar, striatal dopamin saliverilmesinde azalma, nigral dopaminerjik nöronların progresif dejenerasyonu bildirilmiştir (134,135). Ancak modellerin çoğunda, yeterli dopaminerjik nörodejenerasyon ve PH ile ilişkili diğer bulgular gösterilememiştir.

Parkin

Parkin, *PRKN* geni tarafından kodlanan bir ubiquitin E3 ligazdır. Parkin'in enzimatik aktivitesindeki azalmanın, hem sporadik hem de kalıtsal PH'de rol aldığı düşünülmektedir (109). *PRKN* mutasyonları, erken başlangıçlı, otozomal resesif PH ile ilişkilendirilmiştir (136). Hayvan modellerinde; dopamin saliverilmesi ve norepinefrin (NE) seviyelerinde azalma, orta derecede mitokondriyal hasar, oksidatif strese artış görüldüğü bildirilmişse de davranışsal bozukluklar ve SNc dopaminerjik nöronlarında anlamlı derecede kayıp oluşturulamamıştır (109,110). Bununla birlikte, mutant parkin (Parkin-Q311X) proteininin ifade edildiği transgenik fare modelinde, geç başlangıçlı ve ilerleyici motor bozukluklar, SNc dopaminerjik nöron kaybı, striatal dopaminerjik terminallerde azalma gözlenmiştir (137). Viral vektör aracılı, mutant ve insan yabancı parkin proteinlerinin aşırı ifadesinin gerçekleştirildiği bir modelde SNc dopaminerjik nöronların progresif kaybı gösterilmiştir (138).

PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)

PINK1 proteini, Parkin ile beraber, mitofajiye aracılık eder. Hücrelerde mitokondriyal hasar ve oksidatif strese karşı koruyucu olduğu, apoptozis yollarının aktivasyonunu engellediği düşünülmektedir (112). Otozomal resesif ve erken başlangıçlı PH vakalarında *PINK1* gen mutasyonlarında rastlanmıştır (139).

PINK1 knock-out hayvan modellerinde; mitokondriyal işlev kaybının gözlemlendiği, lokomotor aktivitenin ve striatal dopamin seviyelerinin progresif olarak azaldığı bildirilmiştir (140,141). *PINK1* modelleri, nigrostriatal dejenerasyon ve LC

oluşumu gibi hastalığın major bulgularını göstermekte yetersizdir. Yine de hastalığın patofizyolojisini ve ilişkili proteinlerin rollerinin anlaşılmasına katkı sağlayabilirler.

DJ-1

DJ-1 gen mutasyonları otozomal resesif ve erken başlangıçlı PH ile ilişkilidir (142). DJ-1 proteini, mitokondriyal ve transkripsiyonal regülasyonda rol alır, ayrıca oksidatif stres sensörü, proteaz ve şaperon olarak da işlev görür (110). DJ-1 KO fare modellerinde azalmış lokomotor aktivite ve striatal dopamin saliverilmesi gözlenirken, SNc dopaminerjik nöron kaybı ya da dopamin seviyelerinde değişiklik gözlenmez (117). Bununla birlikte, DJ-1 KO ve C57/BL6 farelerinden, geri çaprazlama yöntemiyle elde edilen transgenik hayvanların SNc'lerinde, erken başlangıçlı, unilateral dopaminerjik nöronal kayıp olduğu, zaman içerisinde dejenerasyonun bilateral olarak yayıldığı gözlemlenmiştir. Aynı hayvanlarda, progresif, bilateral locus coeruleus dejenerasyonu ve orta derecede davranışsal bozukluklar bildirilmiştir (143). Bu modelin, tekrarlanabilirliği sağlanırsa, hastalığın erken evrelerinin ve ilerleyici sürecinin araştırılmasında kullanışlı olabileceği öne sürülmüştür

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları

Bu çalışmada başlangıç ağırlığı 220-280 gram arasında olan, 8-10 haftalık, *Sprague Dawley* tipi dişi sıçanlar kullanıldı (n=100). Sıçanlar Hacettepe Üniversitesi Deney Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi (Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu karar no: 2014/44-10). Sıçanlar, kafes ve ortamlarına uyum sağlayabilmeleri için deneylere başlanmadan en az 2 gün önce deneylerin yapılacağı laboratuvara getirildiler. Deneyler süresince sabit nem ve $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda tutuldular. Sükroz tercih testi süresi haricinde yiyecek ve içecek sınırlaması yapılmadı.

3.2. Stereotaksik Cerrahi

Cerrahi işlem öncesi sıçanlara 0,5 mL intraperitoneal (i.p.) ketamin-ksilazin (90:10 mg/kg) karışımı verilerek genel anestezi uygulandı. Hayvanlar ağırlı uyarana yanıt vermeyene kadar beklendi. Anestezi altında, stereotaksik aparata (Stoelting, Stoelting CO, Illinois, ABD) uygun şekilde yerleştirilip kafatası sabitlendi. Kafa derisi povidon iyot ve alkol ile dezenfekte edildi ve orta hattan 1,5 cm kadar kesi açıldı. Skalp ve periosteum yarı steril olarak temizlendi. Stereotaksi atlası (144) referans alınarak öncelikle *incisor bar* kulaklar arası çizginin (*interaural line*) 2,3 mm aşağısına indirildi. SN için; bregma'nın 5,2 mm posterioru ve 2,0 mm sağ, DG için; bregma'nın 5 mm posterioru ve 3,5 mm sağ belirlendi. Kemik dokuda, dura mater görülene dek 1-2 mm çapında delik açıldı. Ucuna cam kapiller takılmış olan Hamilton şırıngasına (10 μL , 26s *gauge*) sırasıyla; 2 μL serum fizyolojik (SF), 1 μL hava, 2 μL virüs çekildi. Sadece SF enjeksiyonu yapılacak hayvanlar için yalnız 2 μL SF çekildi. Hamilton şırıngası ile SN'de 7,2 mm, DG'de 2,6 mm ventrale inildi. Dakikada 0,2 μL hızında olacak şekilde virüs ya da SF ilgili koordinatlara enjekte edildi. Enjeksiyon tamamlanınca, SN'de 5 dakika, DG'de en az 10 dakika beklendikten sonra şırınga 5 saniyede bir 1 mm yukarı çekilerek yavaşça beyin dokusundan çıkarıldı. Cilt kesisi cerrahi iplikle dikildi. Hayvanlara post

operatif olarak 1 mL subkütan (s.c.) SF, 0,7 mL i.p. parasetamol verildi ve hayvanlar anestezinin etkisi geçene kadar homeotermik tabla üzerinde gözetim altında tutuldu.

3.3. Deney Grupları

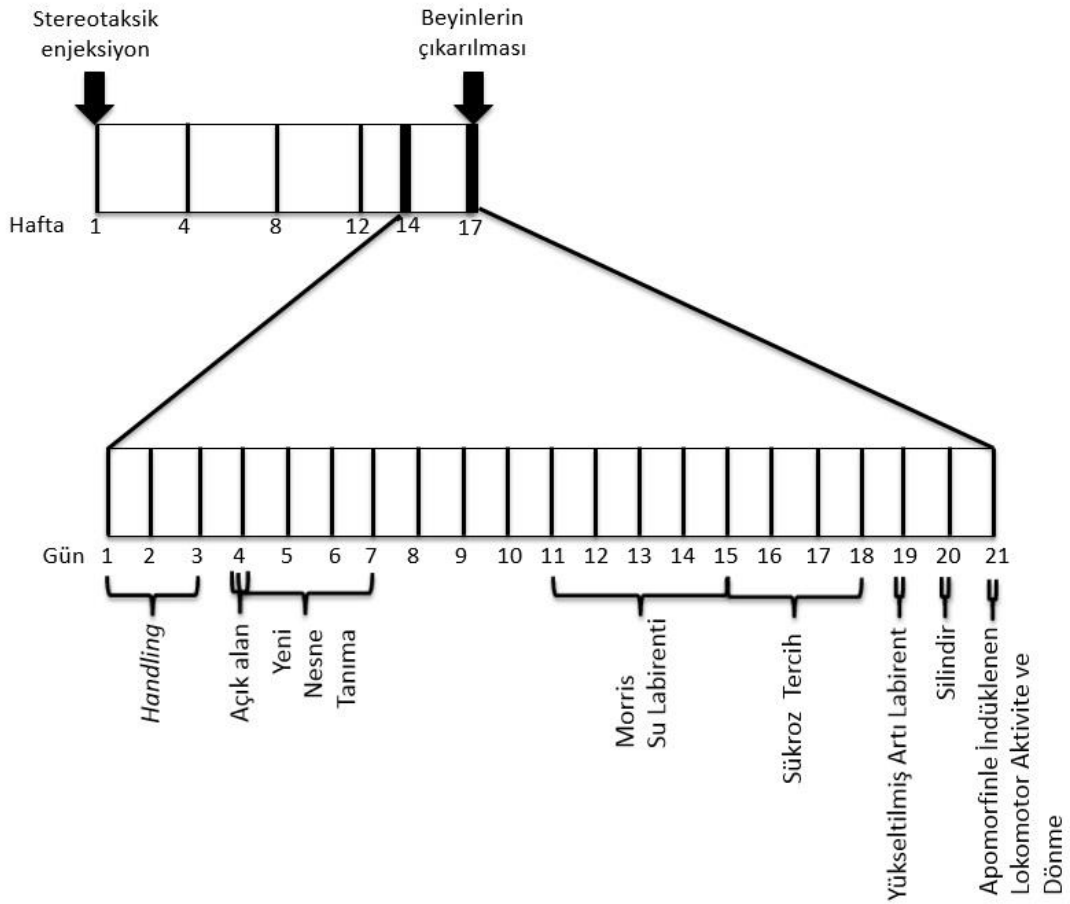
Sıçanlar stereotaksik enjeksiyon yapılan bölgelere ve enjekte edilen gene göre kontrol grupları da dahil olmak üzere toplam 10 gruba ayrıldı;

- (i) SN AAV6-alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan grup (n=12)
- (ii) SN AAV6-GFP enjeksiyonu yapılan grup (n=12)
- (iii) SN serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan grup (n=4)
- (iv) DG AAV6-alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan grup (n=12)
- (v) DG AAV6-GFP enjeksiyonu yapılan grup (n=12)
- (vi) DG serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan grup (n=4)
- (vii) SN ve DG AAV6-alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan grup (n=12)
- (viii) SN ve DG AAV6-GFP enjeksiyonu yapılan grup (n=12)
- (ix) SN ve DG serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan grup (n=6)
- (x) Hiçbir işleme tabii tutulmamış normal sıçanlar (n=14).

Her gruptaki hayvanların yarısı immünohistokimya (İHK) yöntemi, diğer yarısı immünoiblottlama (İB) yöntemi ile incelenmek üzere; İHK analizlerinde kullanılacak grup (n=50) ve İB analizlerinde kullanılacak grup (n=50) olarak ikiye ayrıldı.

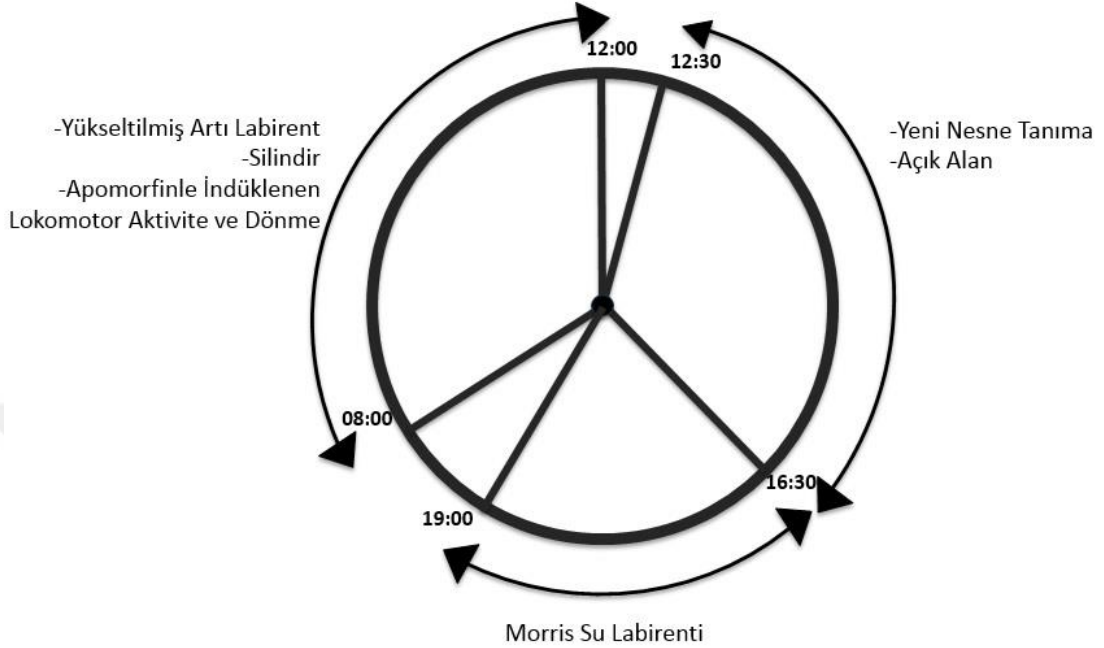
3.4. Motor ve Bilişsel Deneyler

Bütün sıçanlarda enjeksiyonu takiben 14. haftadan itibaren, nigral ve/veya hipokampal hücre ölümü sonucunda ortaya çıkacak motor ve motor dışı bozuklukların değerlendirilmesi amacıyla motor ve bilişsel işlevlerin incelenmesine yönelik deneyler yapıldı. Deneylere başlamadan önce, sıçanların insan temasına alışması ve anksiyetelerinin azaltılması için, sıçanlar en az 2 gün boyunca her gün, yaklaşık 10 dakika kadar tutuldu. Sıçanlar için stresli olabilecek deneylerden sonra diğer deneye geçmeden en az 2 gün ara verildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Motor ve bilişsel işlevlerin incelenmesine yönelik deneylerin tasarımı

Deney sonuçlarının hayvanların gün içi ritimlerinden etkilenebileceği göz önünde bulundurularak, aynı deneyler her bir hayvan grubunda günün aynı zaman diliminde yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Motor ve bilişsel işlevlerin incelenmesine yönelik deneylerin yapıldığı zaman dilimleri

3.4.1. Yeni Nesne Tanıma Testi (YNTT)

Yeni nesne tanıma testi, kemirgenlerin daha önceden alışkın oldukları bir ortamda bulunan yeni nesnelere daha fazla vakit geçirme eğiliminden yararlanılarak yapılan bir hafıza testidir (145).

Bu test için, 40x40 cm büyüklüğünde, 30 cm yüksekliğinde, üstü açık, siyah bir kutu kullanıldı. Hayvanlar testin 1. ve 2. günlerinde 10'ar dakika boş kutuya kondu ve düzeneğe alışmaları sağlandı. 3. gün kutunun sağ ve sol üst kadrantlarına, kutunun çeperlerinden eşit uzaklıkta olacak şekilde birbiriyle aynı renk, boyut ve şekilde olan iki nesne yerleştirildi. Hayvanlar nesnelere arkası dönük olacak şekilde kutunun ortasına kondu ve hayvanların 10 dakika boyunca nesnelere tanınması sağlandı. Kısa dönem belleği test etmek amacıyla, 1 saat sonra, sağ üst kadrantındaki nesne, şekil ve renk olarak farklı olan yeni bir nesne ile değiştirildi ve hayvanlar kutunun ortasına, nesnelere arkası dönük olacak şekilde bırakıldı. 5 dakika boyunca video kamera takip

sistemi (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) kullanılarak kayıt yapıldı. Bu süre içerisinde hayvanların eski ve yeni nesne ile geçirdiği zaman, nesnelere yaptığı ziyaretlerin sıklığı video takip sistemi yazılımı (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) ile analiz edildi. Testin 3. günde yapılan nesnelere tanıma fazından 24 saat sonra, uzun dönem belleği test etmek amacıyla; değiştirilen yeni nesnenin yerine, daha önce kullanılan iki nesneden de renk ve şekil olarak farklı olan yeni bir nesne yerleştirildi. Hayvanlar aynı şekilde kutunun ortasına bırakıldı ve 5 dakika boyunca kayıt yapıldı. Bu süreçte hayvanların eski ve yeni nesne ile geçirdiği zaman ve nesnelere ziyaret sıklığı analiz edildi. Sistemin analiz ayarları; hayvanların nesnelere en az 1,5 cm yaklaşarak, burnu ya da ön ayaklarıyla nesneyi keşfetme davranışı bir ziyaret olacak şekilde ayarlandı. Sonuçlar kısa ve uzun dönem olmak üzere ayrı ayrı, yeni nesneyle geçirilen zamanın her iki nesneyle geçirilen toplam zamana oranı ve yeni nesneyi ziyaret sıklığının her iki nesneye yaptığı toplam ziyaret sıklığına oranı şeklinde hesaplandı.

3.4.2. Morris Su Labirenti Testi

Morris su labirenti testi, kemirgenlerin uzaysal öğrenme ve bellek kapasitelerini ölçmeye yarayan bir testtir (146).

Bu test için, 143 cm çapında, siyah bir tankın içine, tankla aynı renkte olan bir platform yerleştirildi. Tank 22-26°C sıcaklığında suyla dolduruldu. Platformun yüksekliği su yüzeyinden 3 cm aşağıda olacak şekilde ayarlandı. Tankın etrafına hayvanların görebileceği şekilde çeşitli ipuçları yerleştirildi ve oda loş ışıkla aydınlatıldı. Hiçbir işlem uygulanmamış kontrol grubu ile yaptığımız ön deney sonuçları referans alınarak öğrenmenin 4. günde gerçekleştiği varsayıldı. Sıçanlar 4 gün boyunca her gün, her defasında farklı noktalardan olmak üzere 4 kez, tankın merkezine arkaları dönük olarak tanka bırakıldı. Hayvanların, 2 dakika boyunca, gizlenmiş olan platformu bulmaları beklendi. İlk gün, 2 dakika içinde platformu bulamayan sıçanlar platformun üzerine konulup 5 saniye platformun üzerinde bekletildi ve sıçanların platformun yeri öğretilmeye çalışıldı. 5. gün platform kaldırıldı. Bütün hayvanlar tankın sadece bir noktasından tanka bırakıldı ve 90 saniye içinde

önceden platformun olduğu bölgeyi bulmaları beklendi. Platform bölgesinde en az 2 saniye geçiren hayvanların platformu bulmuş olduğu kabul edildi. Deneyler video kamera takip sistemi (VideoMot2, TSE Systems, Thuringia, Germany) ile kaydedildi. Video kamera takip sistem yazılımı (VideoMot2, TSE Systems, Thuringia, Germany) kullanılarak her gün için ayrı olmak üzere, platformu bulma süreleri ve kadrarlarda geçirilen süreler analiz edildi. Hayvanların platformu bulma süreleri gün bazında, 4 denemenin ortalaması alınarak hesaplandı. 4 günün sonunda hayvanların platformu bulma süreleri kullanılarak öğrenme eğrileri çizildi. 5. gün yapılan *probe* testinin sonuçları; platform bölgesini bulma süresi ve platformun olduğu kadrarda geçirilen zaman olarak hesaplandı.

3.4.3.Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi kemirgenlerin anksiyete benzeri davranışlarını değerlendirmek için kullanılır (147). Yükseltilmiş artı labirent düzeneği; siyah pleksiglastan yapılmış, artı şeklinde, bütün kolları yerden 70 cm yükseklikte, 45 cm uzunlukta ve 12 cm genişliktedir. Birbirine zıt iki kol 45 cm yüksekliğinde duvarlarla çevrili olup uçları kapalı iken diğer iki kol tamamen açıktır. Tam ortada bulunan 12x12 cm'lik alandan tüm kollara erişilebilmektedir.

Bu testte, düzeneğin bulunduğu oda loş ışıkla aydınlatıldı. Testin başlangıcında hayvanlar ortadaki alana, yüzü soldaki kapalı kola dönük olacak şekilde yerleştirildi ve hayvanların davranışları 5 dakika süreyle video kamera takip sistemi (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) ile kaydedildi. Açık kollardan yere düşen hayvanlar, alınıp en son düştükleri yere konuldu ve kayıt devam ettirildi. Hayvanların orta alanda, açık ve kapalı kollarda geçirdikleri toplam zaman video kamera takip sistem yazılımı (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) ile analiz edildi. Bulgular açık ve kapalı kollarda geçirilen sürenin toplam süreye oranı şeklinde ifade edildi.

3.4.4. Sükroz Tercih Testi

Sükroz tercih testi, kemirgenlerin şekerli içecekleri suya göre daha çok tercih etme eğiliminden yararlanılarak anhedoniye değerlendirmek için kullanılır. Kronik strese maruz bırakılan anhedonik sıçanlarda sükrozlu çözelti tüketiminin azaldığı gözlemlenmiştir (148).

Sıçanlar gruplarına göre ayrı ayrı kafeslere alınarak, aynı gruptan olan sıçanların bir arada olması sağlandı. İki gün boyunca, kafeslere hem %2'lik sükroz çözeltisi hem de su yerleştirildi ve sükroz çözeltisine alıştırma fazı gerçekleştirildi. Hayvanların sağ veya sol taraftaki suluğu tercih etme eğilimini önlemek amacıyla sulukların yerleri ilk günün sonunda değiştirildi. 2. günün sonunda iki suluk da alınarak hayvanlar 8 saat susuz bırakıldı. 24 saat süren test fazı için; önceden hazırlanıp tartılmış su ve %2'lik sükroz çözeltisi verildi. Sağ veya sol taraf tercih yanlılığını önlemek amacıyla 12 saat sonra sulukların yerleri değiştirildi. 24 saat sonunda içme suyu ve %2'lik sükroz çözeltisi içeren suluklar tartıldı. Hayvan başına tüketim miktarı, gram olarak, her kafes için toplam tüketim miktarının kafesteki hayvan sayısına bölünmesiyle hesaplandı. Sonuçlar grup başına; tüketilen sükroz çözeltisinin tüketilen su ve sükroz çözeltisinin toplamına oranının yüzdesi olarak verildi.

3.4.5. Silindir Testi

Silindir testi hayvanlarda tek taraflı enjeksiyon sonrası oluşan motor asimetriyi değerlendirmek için kullanılır. Motor asimetri, kontralateral ön ayağın silindir çeperine değme sayısı ile kantitize edilir (149).

Bu test için hayvanlar, 25 cm çapındaki cam bir silindire yerleştirildi. Silindirin arkasına uygun açılarda yerleştirilen 3 ayna ile kayıt esnasında silindirin her tarafının görülebilir olması sağlandı. Loş ışıkta yüksek kalitede kayıt yapma olanağı sağlayan bir kamera (Sony Handycam DCR-HC37) ile, 10 dakika boyunca hayvanların davranışları kayıt edildi. Daha sonra izlenen kayıtlarda, hayvanların silindir çeperine sağ ön ayaklarıyla, sol ön ayaklarıyla ve hem sağ hem sol ön ayaklarıyla aynı anda kaçar defa dokunduğu sayıldı. Çepere dokunmak için sağ ve sol ön ayakların aynı anda kullanıldığı durumlar, sağ ve sol olmak üzere ayrı ayrı birer dokunma olarak

kaydedildi. Sonuçlar ipsilateral (sağ) ve kontralateral (sol) ön ayaklarla çepere dokunma sayısının toplam dokunma sayısına oranının yüzdesi olarak hesaplandı (Formül 3.1 ve 3.2)

$$\% \text{İpsilateral Dokunma} = 100 \times \frac{\text{Sağ}}{\text{Yalnız Sağ} + \text{Yalnız Sol} + (2 \times \text{Hem Sağ Hem Sol})} \quad (3.1)$$

$$\% \text{Kontralateral Dokunma} = 100 \times \frac{\text{Sol}}{\text{Yalnız Sağ} + \text{Yalnız Sol} + (2 \times \text{Hem Sağ Hem Sol})} \quad (3.2)$$

3.4.6. Açık Alan Lokomotor Aktivite Testi

Açık alan lokomotor aktivite testi ile hayvanların, alışkın olmadıkları bir ortamda, çevreyi keşfetme davranışlarından yararlanılarak hareketlilikleri, buna bağlı olarak da motor aktiviteleri ölçülür.

Bu test için hayvanlar 40x40 cm boyutunda ve 30 cm yükseklikte olan, siyah, üstü açık bir kutunun içerisine yerleştirildi ve 5 dakika boyunca bir video kamera takip sistemi (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) kullanılarak kaydedildi. Bu süre içinde toplam katettikleri mesafe ve ortalama hızları video takip sistemi yazılımı (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) ile analiz edildi.

3.4.7. Apomorfinle İndüklenen Lokomotor Aktivite ve Dönme Testi

Apomorfin selektif olmayan dopamin reseptör agonisti olup striatumda etkisini postsinaptik dopaminerjik reseptörler aracılığıyla gösterir. D1 ve D2 reseptörlerinin stimülasyonu ile hayvanlarda lokomotor aktivitede artış ve stereotipik davranışlar gözlenir. Unilateral enjeksiyon yapılmış hayvanlarda, apomorfin, lezyon tarafındaki striatumda denerve olmuş dopaminerjik reseptörlerin artan duyarlılığı nedeniyle kontralateral dönmeye yol açar (150). Lezyon tarafındaki dopaminerjik kaybın en az %90 olduğu hayvanlarda dakikada 6 veya daha fazla sayıda dönme gözlemlendiği bildirilmiştir (151,152).

Bu test için, 40x40 cm büyüklüğünde, 30 cm yüksekliğinde, üstü açık, siyah bir kutu kullanıldı. Hayvanlar 1 mg/kg subkütan apomorfin verilmesini takiben kutuya

yerleştirildi. Video kamera takip sistemi (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) kullanılarak 40 dakika kayıt yapıldı. Apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testi için 15. ve 20. dakikalar arasındaki toplam katedilen mesafe ve ortalama hızları video takip sistemi yazılımı (EthoVision®XT, Noldus Informational Technology, Wageningen, Hollanda) ile analiz edildi.

Apomorfinle indüklenen dönme testi için ise enjeksiyonu takiben kutuya bırakılan hayvanların onuncu, yirminci ve otuzuncu dakikalardan itibaren 3'er dakika boyunca, kendi etrafında kaç defa döndüğü sayıldı. Hayvanın kendi etrafında dönerek 360 dereceyi tamamlaması 1 dönme olarak kabul edildi, bunun dışındaki dönüşler sayılmadı. Sonuçlar ipsilateral ve kontralateral dönme sayıları şeklinde verildi.

3.5. İmmünoblotlama

İmmünoblotlama doku örneklerindeki proteinlerin saptanması için kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Proteinler jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. Jelin üzerindeki proteinlerin, elektriksel bir alanda, oluşturulan akım ile jelden PVDF veya nitroselüloz membrana "göç" etmesi sağlanır. Membrandaki hedef proteinlere özgü primer antikorlar ile membran inkübe edilir ve antikor hedef proteinine bağlanır. Görüntüleme için; membran, kullanılan primer antikorlarla etkileşen sekonder antikorlarla inkübe edilir. Sekonder antikorun konjuge edildiği enzime göre seçilen substrat membrana uygulanır. Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün ile hedef proteinlerin olduğu bantlar görülebilir hale gelir ve görüntü alınır.

3.5.1. Beyin Kısımlarının Disseksiyonu

Hayvanlar karbondioksit gazı verilerek sersemletildi. Giyotinle dekapitasyon yapıldı ve beyinler hızla çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokularından, sağ ve sol olmak üzere striatum ve hipokampus kısımları disseksiyon ile ayrıştırıldı. Disseksiyon işlemi, içerisinde donmuş yapay beyin-omurilik sıvısı (BOS) bulunan ve sürekli olarak oksijenlendirilen petri kaplarında gerçekleştirildi. Ayrıştırılan beyin kısımları tüplere (Eppendorf, 1,5 mL) alınarak sıvı azot içerisinde donduruldu ve -80°C'de saklandı.

3.5.2. Doku Homojenizasyonu

Proteinlerin jel üzerinde hareket ederek ayrışabilmeleri için doku ve hücrelerin parçalanarak söz konusu proteinlerin açığa çıkarılmaları gerekir. Bu amaçla; doku ve hücreleri parçalamak için *radioimmunoprecipitation* (RIPA) tamponu, parçalanmayı takiben gerçekleşen proteolizisi ve denatürasyonu yavaşlatmak için %2'lik proteaz inhibitör kokteyli kullanıldı. Beyin örnekleri tartılarak örneklerin bulunduğu tüplere (Eppendorf 1,5 mL) 10 µl/mg beyin ağırlığı olacak şekilde RIPA ve eklenen RIPA tamponunun 50'de 1'i kadar proteaz inhibitörü eklendi. İşlem boyunca örnekler buz dolu bir kabın içerisinde muhafaza edildi. Tampon ve inhibitör eklenen örnekler ultrasonik homojenizatör (Omni Sonic Ruptor 400, Ultrasonic Homogenizer, Georgia, ABD) ile 5-10 saniye, gözle görülen partikül kalmayana dek, homojenize edildi. Elde edilen homojenat, soğutmalı santrifüj cihazında (Kubota Centrifuge 3500, Kubota Corporation, Tokyo, Japonya), 14.000 rpm'de, +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar farklı tüplere (Eppendorf, 1,5 mL) alındı. Pelletler -80°C'ye kaldırıldı.

3.5.3. Protein Tayini

Her bir süpernatantın içindeki protein miktarı *bicinchoninic acid* (BCA) yöntemi (153) kullanılarak ölçüldü. Bunun için hazır BCA kiti (23225, Thermo Scientific, ABD) artan konsantrasyonlarda 7 adet *bovine serum albumine* (BSA) içeren protein çözeltisi ve 1 adet yalnız distile su içeren kör çözelti hazırlandı. Protein tayini yapılacak olan hipokampus ve striatum süpernatantlarından, 1:100 seyreltme oranına uygun olacak şekilde, numuneler hazırlandı. BCA çözeltisi (Reagent A) ve %4'lük bakır sülfat çözeltisi (Reagent B) 50:1 oranında karıştırılarak bir *working solution* hazırlandı. Numune ve standartlardan 25'er µL alınarak, her numune ve standarttan üçer kez olacak şekilde, 96 kuyucuklu mikropklara kondu ve her bir kuyucuğa 200 µL *working solution* eklendi. Karışım etüvde, 37°C'de 30 dakika inkübe edildi, ölçümden önce oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek karışımın sıcaklığı düşürüldü. Spektrofotometre ile 562 nm'de numune ve standartların absorbans değerleri ölçüldü. Standartların absorbans değerleri kullanılarak standart protein

konsantrasyonu-absorbans grafiği çıkarıldı. Standart grafik kullanılarak her bir numunedeki protein konsantrasyonu hesaplandı. Her numune için eşit miktarda protein içeren süpernatant hacmi, jele yüklenmek istenen protein miktarının numunenin konsantrasyonuna bölünmesi ile bulundu.

3.5.4. Numunelerin Hazırlanması

Antikorlar tipik olarak, proteinlerin spesifik bölgelerine bağlanırlar. Bu bölgeler proteinin 3 boyutlu yapısı içinde yer alabilir. Antikorların proteinlerin bağlanma bölgesine erişebilmesi için proteinin denatüre edilerek ve sülfid bağlarının koparılması proteinin 3 boyutlu yapısının düz zincir haline getirilmesi gerekir. Proteinlerin denatürasyonu için genellikle anyonik deterjanlar, sülfid bağlarının koparılması için indirgeyici ajanlar kullanılır.

Proteinlerin yapısını düz zincir haline getirmek amacıyla; her süpernatanttan uygun hacimde alınarak tüplere (Eppendorf, 0,2 mL) kondu. Proteinlerin denatürasyonu için LDS *Sample buffer* (NP0008, LDS Sample Buffer 4X, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), indirgenmesi için β -merkaptoetanol kullanıldı. Kuyucuklara yüklenecek toplam hacmin 4'te 1'i kadar *sample buffer*, 10'da 1'i kadar β -merkaptoetanol numunelere eklendi. Kalan hacim distile su ile tamamlandı. Numune, denatüre edici ajan, indirgeyici ajan ve distile su içeren tüpler (Eppendorf 0,2 mL) santrifüj cihazına konarak hız 2500 rpm'e çıkana kadar çevrildi ve iyice karışmaları sağlandı. Proteinlerin denatürasyonu için karışımlar 90°C'de 5 dakika ısıtıldı ve -20°C'de 30 saniye bekletilerek şoklama yapıldı.

3.5.5. Numunelerin Jele Yüklenmesi ve Yürütme

İmmunoblotlamada süpernatantın protein bileşenlerinin ayrılmasında jel elektroforezi kullanılır. Protein zincirleri numune hazırlama aşamasında kullanılan anyonik deterjan ile uzunlukları ile orantılı olacak şekilde negatif olarak yüklenir. Proteinler jelin ağ benzeri yapısı içinde oluşturulan elektriksel alanda artı kutba doğru ilerler. Protein zincirlerinin birim başına taşıdıkları yük miktarları eşit olduğundan, ayrışma moleküler ağırlıklarına göre olur. Farklı moleküler ağırlıklı proteinler farklı

hızlarda hareket ederler ve böylece ağ benzeri jel üzerinde bantlar halinde yığılım göstererek ağırlıklarına göre ayrılmış olurlar.

Proteinlerin ayrıştırılması için (Nu-PAGE™ %4-12 bis-tris, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) 10 kuyucuklu hazır jel kullanıldı. Jeller elektroforez cihazına (Apollo Instrumentation) yerleştirildi. Yürütme tamponu olarak 20X 3-(N-morfolino) propansülfonik asit (NP001, MOPS SDS running buffer, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) 20X 2-(N-morfolino) ethansülfonik asit (NP002, MES SDS running buffer, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) veya laboratuvarında hazırlanan MOPS-SDS yürütme tamponu kullanıldı. Tamponlar kullanılmadan önce 1X'e seyreltildi. 500 mL hazırlanan tamponun bir kısmı, kuyucukları tamamen kapatacak şekilde, jellerin arasındaki havuza, kalan kısmı dış havuza döküldü. Numuneler yüklenmeden önce jel kuyucuklarını kapatan tarak jelle zarar vermeden çıkarıldı ve kuyucuklar insülin iğnesi yardımıyla yürütme tamponu ile yıkandı. İlk kuyucuğa 7 µL moleküler ağırlık belirteci (LC5925, SeeBlue® Plus2 Prestained Standart, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) diğer kuyucuklara numuneler yüklendi. Yüklemeler, aynı jelde eşit sayıda alfa-sinüklein ve GFP enjeksiyonu yapılan hayvan numunesi olacak şekilde yapıldı. Jellerin son kuyucukları boş bırakıldı. Elektroforez, 90 voltta yaklaşık olarak 120 dakikada gerçekleştirildi. Elektroforezin ilk 10 dakikası numunelerin eşit hızda ve uniform bir şekilde yürüyüp yürümediği takip edildi. Yürütme işleminin sonlandırılması için numunelerin, moleküler ağırlık belirteci göre, 14 kDa seviyesini geçmesi beklenildi.

3.5.6. Proteinlerin Transferi

Transfer düzeneğinde, elektriksel alan ve transfer çözeltisi yardımıyla jelden membrana doğru elektriksel geçirgenlik oluşturulur, böylece proteinlerin jelden membrana aktarılması sağlanır.

Transfer yarı-kuru düzenek kullanılarak yapıldı. 20X transfer tamponu (NP006, NuPAGE® Transfer Buffer (20X), Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) son hacmin %10'u metanol olacak şekilde distile su ve metanol ile 1X'e seyreltildi. Proteinlerin transfer edileceği membranlar, fazla sıvıyı absorbe etmesi için kullanılan

kurutma kağıtları ve havlu kağıtlar uygun boyutlarda hazırlandı. PVDF membranların hidrofobikliğini azaltarak proteinleri daha iyi bağlamasını sağlamak için membranlar 5 dakika metanolla yıkandı. Ardından 1 dakika distile suda ve son olarak transfer tamponuyla 20 dakika yıkandı. Kurutma kağıtları da yüzeylerinde kalabilecek ve protein transferinin verimini düşürebilecek hava kabarcıklarının gitmesi için 20 dakika transfer tamponuyla yıkandı. Daha önceden hazırlanan 3 kat havlu kağıt transfer cihazına (Apollo Instrumentation) kondu. Transfer tamponu ile iyice ıslatıldı ve arada hava kabarcığı kalmaması için üzerinden rulo ile geçildi. Çıkarılan jelin üzerine membran yerleştirildi, membranın üzerine ve jelin altına membran ve jelle aynı boyutlarda kesilen kurutma kağıtları yerleştirildi. Sırasıyla; kurutma kağıdı, membran, jel ve kurutma kağıdından oluşan sandviç, membran alta gelecek şekilde transfer cihazındaki havlu kağıtların üzerine yerleştirildi. En üste tekrar 3 kat havlu kağıt konuldu. Katmanlar arasında elektriksel geçirgenlik oluşturarak proteinlerin transferini gerçekleştirmek için, katmanlar transfer tamponu ile ıslatıldı ve üzerlerinden rulo ile geçilerek aralarında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Birden fazla membrana transfer yapılacağı zaman, kurutma kağıdı, membran, jel ve havlu kağıtlardan oluşan sandviçler birbirleri ile temas etmeyecek şekilde transfer cihazına yerleştirildi ve cihazın transfer tamponu ile ıslanmış diğer kısımları kurulandı. Makinenin üst kapağı kapatılarak sabitlendi. Akım şiddeti membran başına 120 mA olacak şekilde ayarlanarak en az 3 saat beklendi.

3.5.7. Membranların Blokajı ve Primer Antikorlarla İnkübasyonu

İmmunoblotlama için kullanılan membranlar her tür proteini, seçici olmaksızın bağlar. Antikorların membrana spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için membranların blokaj solüsyonu ile bloke edilmesi gerekir. Yağsız süt tozu içindeki proteinler membrana spesifik olmayan bir şekilde bağlanır. Böylece antikorların hedef olmayan bölgelere bağlanması engellenir. Ayrıca süt tozundaki proteinlerin immünojenisiteleri düşük olduğundan antikorları bağlayarak kirlilik oluşturma olasılığı da düşüktür. Bu nedenle; blokaj için, TBST (28360, Pierce 20X TBS Tween-20, Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) içinde %5 g/mL olacak şekilde yağsız süt

tozu ile hazırlanan solüsyon kullanıldı. Membranlar transfer aşamasından sonra blokaj solüsyonu ile dolu petri kaplarında, oda sıcaklığında, 1 saat boyunca orbital çalkalayıcıda sallandı. Blokaj aşamasından sonra, membranlar, TBST içinde belirli oranlarda seyreltilerek hazırlanmış primer antikor çözeltileri ile inkübe edildi.

Dokularda ifade edilen alfa-sinüklein ve GFP miktarlarını ölçmek için monoklonal anti-alfasinüklein antikor (ab80627, Abcam) ve anti-GFP antikor (ab13970, Abcam) kullanıldı. Membranlar 1:1000 seyreltme oranında hazırlanmış anti-alfa-sinüklein antikor çözeltisi ile 16 ila 20 saat boyunca, +4°C'de, 1:1000 seyreltme oranında hazırlanmış anti-GFP antikor ile 1 saat boyunca, +25°C'de, çalkalayıcıda sallanmaya bırakılarak inkübe edildi. Sinaptik kaybın değerlendirilmesi amacıyla, sinaptofizin miktarları monoklonal anti-sinaptofizin antikor (S 5768, Sigma Aldrich) kullanılarak ölçüldü. Membranlar 1:500 seyreltme oranında hazırlanmış anti-sinaptofizin antikor ile 16-18 saat boyunca, +4°C'de inkübe edildi. Proteinlerin, jellere yükleme, membrana transfer ve antikorlarla inkübasyon aşamalarının her bir numune için aynı etkililikte ve sorunsuz bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü amacıyla yükleme kontrolü olarak, santral sinir sistemi nöronlarında yaygın olarak bulunan beta-tubulin-III proteini seçildi. Beta-tubulin-III miktarlarını ölçmek için, membranlar 1:7500 seyreltme oranında hazırlanmış anti-beta-tubulin III antikor (T 2200, Sigma Aldrich) ile 30-40 dakika boyunca, +4°C'de inkübe edildi.

3.5.8. Sekonder Antikorlarla İnkübasyon ve Görüntü Alma

Sekonder antikorlar, hedef proteine bağlanmış olan primer antikorları tanıyarak onlara bağlanır. Görüntü almak için kullanılan substrat, sekonder antikora konjuge edilmiş enzim ve ortama eklenen hidrojen peroksit varlığında, ışımaya yapan bir reaksiyon ürününe okside olur.

Membranlar, bağlanmamış primer antikorları uzaklaştırmak için primer antikor çözeltilerinden alındı ve TBST ile 3 kez 10'ar dakika çalkalayıcıda sallanarak yıkandı. Primer antikorlar ile oluşturulan bantların görüntülenebilmesi için, kullanılacak görüntüleme yöntemine uygun olarak, HRP bağlı sekonder antikorlar kullanıldı. Membranlar anti-alfa-sinüklein ve anti-sinaptofizin antikorlarından sonra

anti-mouse (7076, Cell signalling technology Inc.), anti-GFP antikorundan sonra *rabbit anti-chicken* IgY H&L (ab6753, Abcam) sekonder antikorları ile +25°C'de, 1 saat inkübe edildi. Anti- β -tubulin III antikorundan sonra ise *anti-rabbit* (7074, Cell signalling technology Inc.) sekonder antikorı kullanıldı ve inkübasyon; +25°C'de 30-40 dakika boyunca gerçekleştirildi. Bağlanmayan sekonder antikorları ve kirliliği uzaklaştırmak için, TBST ile 2 kez 10'ar dakika, distile suyla 1 kez en az 10 dakika yıkama yapıldı.

Görüntüleme için hazır substrat kiti (34095, Thermo Scientific) kullanıldı. Kit içinden çıkan luminol ve peroksid tamponu 1:1 oranında karıştırılarak kemiluminesans karışımı hazırlandı. Görüntü alma cihazına (Kodak Image Station 4000 MM) yerleştirilen membranda, bant görülmesi beklenen seviyelerin (alfa-sinüklein:14 kDa, GFP:25 kDa, sinaptofizin:38 kDa, β -tubulin III:55 kDa) üzerine yaklaşık 0,4 mL kemiluminesans karışımı mikropipet yardımıyla uygulandı ve homojen şekilde yayılması sağlandı. Membran yaklaşık 4 dakika boyunca substrat ile inkübe edildi. İnkübasyon sırasında art arda görüntüler alındı ve görüntü işleme yazılımı (Carestream MI Software 5.0.2.26, Carestream Health, ABD) ile dijital halde kaydedildi. İnkübasyondan sonra substratın fazlası membrandan uzaklaştırılarak tekrar görüntüler alındı ve kaydedildi.

3.5.9. Görüntülerin Değerlendirilmesi

Kaydedilen görüntülerde alfa-sinüklein, GFP, sinaptofizin ve β -tubulin proteinlerinin bant yoğunlukları görüntü işleme yazılımı (Image J 1.49v, National Institutes of Health, ABD) kullanılarak hesaplandı. Yükleme ve transfer aşamaları sırasında meydana gelmiş olabilecek farklılıklar göz önüne alınarak; alfa-sinüklein, GFP ve sinaptofizin bantlarının yoğunlukları söz konusu numune için ölçülen β -tubulin III proteininin bant yoğunluğuna oranlandı. Farklı gruptaki numuneler karşılaştırılırken bu oranlar kullanıldı.

3.6. İmmünohistokimya

İmmünohistokimya, dokularda spesifik antijenlerin immunolojik ve kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla saptanmasını sağlayan bir tekniktir. Temel olarak dokudaki

spesifik antijene bağlanan bir primer antikör ve primer antikora bağlanan bir sekonder antikör kullanılır. Sekonder antikör bir enzim, flüoresan protein ya da biotin ile konjuge edilmiştir. Enzimle konjuge edilen sekonder antikörler kullanıldığında, ilgili substrat ortama eklenir, enzimatik reaksiyon ürünü olarak renkli bir çökelti oluşur ve boyanma gözlenir. Böylece proteinlerin dokulardaki dağılımı ve yerleşimi gösterilebilir.

3.6.1. Beyinlerin Perfüzyonu

Hayvanlara 1,5-2 mL ketamin:ksilazin (90:10 mg/kg) solüsyonu i.p. olarak enjekte edilerek genel anestezi uygulandı. Hayvanlar ağrılı uyarana yanıt vermeyene kadar beklendi. Kardiyak arrest gerçekleşmemesi için göğüs kafesi hızlıca açılarak sol ventriküle kelebek iğne yardımıyla girildi ve sağ atriya kesik atıldı. Perfüzyon pompası yardımıyla yaklaşık bir dakika boyunca sol ventrikülden heparin (200 IU) verildi. Heparin'in ardından, yaklaşık 4 dakika boyunca, kasılmalar durana kadar paraformaldehit infüze edildi. Hayvanlar uygun ekipmanlar kullanılarak dekapite edildi ve beyinleri çıkarıldı.

Çıkarılan beyinler 1 gün boyunca, oda sıcaklığında, paraformaldehit (PFA) çözeltisinde bekletilerek fikse edildi, daha sonra %25'lik sükröz çözeltisine alınarak, +4°C'ye, buzdolabına kaldırıldı.

3.6.2. Beyin Kesitlerinin Hazırlanması

Beyin kesitleri kriyostat (Leica 1100CM, Leica Biosystems) ve mikrotom (Leica SM2000 R, Leica Biosystems) cihazları kullanılarak alındı. Kriyostat cihazı ile kesit alma işlemine başlanmadan önce, kesitlerin alınacağı lamlar poli-l-lizin solüsyonuyla kaplanarak pozitif olarak yüklenmeleri sağlandı. Poli-l-lizin kaplaması için; lamlar bütün yüzeyleri solüsyonla temas edecek şekilde %10'luk poli-l-lizin solüsyonuna (P8920, Sigma-Aldrich, ABD) daldırıldı, solüsyonda 5 dakika bekletildi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Kriyostat cihazı ile, beyinlerden, özellikle; striatum, SN, hipokampus ve çevre yapılarından yeterli örnek olacak şekilde, 20 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan kesitler immünohistokimyasal boyamalar yapılana kadar -20°C' de saklandı.

Mikrotom cihazı ile kesit alma işlemi için mikrotomun haznesi ve beyinin etrafı kuru buz ile beslenerek donduruldu. Kesitler 35 µm kalınlığında olacak şekilde alındı. 24 kuyucuklu plaklar kullanıldı ve kuyucuklar birden yirmidörde kadar numaralandırıldı. Alınan kesitler sırası ile bu kuyucuklara konularak her bir kuyucukta beyinin bütün bölgelerinden kesitlerin olması hedeflendi. Beyinlerin bozulmadan saklanabilmesi için kuyucukların içerisine etilen glikol ve gliserol içeren bir *anti-freeze* solüsyonu konuldu.

3.6.3. Antigen Retrieval (AR)

Formalin ve PFA ile fiksasyon aşamasında dokularda oluşan metilen köprüleri çapraz olarak bağlanarak antijenik bölgeleri maskeleyebilirler. Bu nedenle İHK boyaması yapmadan önce AR yapılması tavsiye edilir. AR ile bu köprüler yıkılarak antikörlerin bağlanacağı antijenik bölgeler ortaya çıkarılır. Antikör bağlanma bölgelerinin ortaya çıkarılması; sıcaklıkla indüklenen AR ve enzimatik AR olmak üzere iki şekilde yapılabilir.

Bu çalışmada kriyostat cihazı ile alınan kesitlerde, İHK boyamalarından önce enzimatik AR yapıldı. %0,5 tripsin stok ve %1 kalsiyum klorür stok solüsyonları kullanılarak % 0,05 tripsin solüsyonu hazırlandı. Solüsyonun pH değeri, 1 N sodyum hidroksit (NaOH) ile, 7.8 ± 1 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan tripsin solüsyonu 30 ila 45 dakika 37 °C' de etüvde bekletildi. AR yapılacak kesitler, nemlendirilmiş bir lam kabına yatay olacak şekilde yanyana dizildi. Uygulanacak solüsyonun lamaların kenarından dökülmemesi için lamaların kenarları PAP *pen* ile çizilerek hidrofobik bariyer oluşturuldu. Isıtılan solüsyon, mikropipet yardımıyla, lam üzerindeki bütün dokuları kaplayacak şekilde uygulandı. Kesitler, lam kabının içerisinde 37 °C'ye ayarlanmış etüvde, 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonunda lamaların üzerindeki tripsin solüsyonu dökülerek boyama protokolüne geçildi.

3.6.4. İHK Boyama

Kriyostat cihazı ile alınan kesitlerin boyamalarında hazır İHK kiti (ab80436, Abcam) kullanıldı. Primer antikörle inkübasyon basamağı hariç bütün uygulamalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Lamların kenarları tekrar PAP *pen* ile çizildi. Kesitler % 0,05 PBS-t ile 2x5 dakika olacak şekilde yıkandı. Endojen hidrojen peroksidazlar boyama aşamasındaki substratla etkileşerek spesifik olmayan boyanmalara neden olabileceği için kesitlere, kitteki hidrojen peroksidaz blokaj solüsyonu uygulanarak 10 dakika beklendi. Ardından dokular PBS-t ile tekrar 2x5 dakika olacak şekilde yıkandı. Ayrıca ilgi alanı olmayan proteinlere bağlanmayı önlemek amacıyla, kitteki protein blokaj solüsyonu kullanıldı. Kesitler bu solüsyonda 10 dakika bekletildi. Daha sonra dokular 1 defa PBS-t ile yıkandı. Kesitler, PBS-t içinde belirli oranda seyreltilmiş primer antikör çözeltileri ile inkübe edildi ve +4°C'de, 18-24 saat buzdolabında bekletildi. İnkübasyondan sonra kesitler 3x5 dakika olacak şekilde PBS-t ile yıkandı. Kesitlere kitteki kompleman çözeltisi uygulanarak 10 dakika beklendi ve yine 5'er dakika olacak şekilde 2 defa yıkandı. Son olarak kitteki HRP-konjugatı kesitlere uygulandı ve 15 dakika beklendi. 5'er dakikalık 4 yıkama yapıldı. Kitteki DAB kromojen ve DAB substratından, sırasıyla 1:50 oranında olacak şekilde, DAB solüsyonu hazırlandı. Solüsyon kesitlere uygulanarak boyamalar gerçekleştirildi.

Mikrotom cihazı ile alınan kesitlerin boyamalarında Acu-Stain HRP Kit (52-0003, Genemed) kullanıldı. Bütün uygulamalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Kuyucuklardaki kesitler ilk olarak Tris-HCl ile 2x5 dakika olacak şekilde yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla dokular *quenching* solüsyonu ile 20 dakika yıkandı. *Quenching* aşamasından sonra dokular 3x10 dakika veya 4x5 dakika olacak şekilde % 0,05 TBS-t ile yıkandı. Antikörün diğer proteinlerle spesifik olmayan etkileşimlerini önlemek için kesitlere kitteki blokaj solüsyonu uygulandı ve 10 dakika beklendi. Blokaj aşamasından sonra dokular % 0,05 TBS-t içinde belirli oranlarda hazırlanmış primer antikör çözeltileri ile 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra dokular % 0,05 TBS-t ile 3x10 dakika olacak şekilde yıkandı ve kitteki biotin ile konjuge edilmiş sekonder antikör içeren çözelti ile 10 dakika inkübe edildi. % 0,05'lik TBS-t ile 10'ar dakika 3 yıkama yapıldı. Son olarak kitteki HRP ile konjuge streptavidin

solüsyonu kesitlere uygulandı ve 10 dakika beklendi. % 0,05 TBS-t ile 2x10 dakika, Tris-HCl ile 1x10 dakika olacak şekilde yıkama yapıldı. Boyama için hazır DAB kiti (K4010, Dako EnVision + System-HRP, ABD) kullanıldı. DAB kromojen, DAB substratı ve hidrojen peroksitten oluşan solüsyon hazırlandı. Solüsyon kuyucukların içindeki kesitlere uygulandı ve boyanma görülene kadar beklendi. Boyanan dokular içerisinde yalnızca tampon çözeltisi bulunan kuyucuklara alındı. Yayma işlemi için; uygun boyutta suluboya fırçaları kullanılarak kesitler lamaların üzerine alındı. Yayma işleminde dokuların hasar görmemesine ve katlanmamasına dikkat edildi.

3.6.5. Kullanılan Primer Antikorlar

Dokularda alfa-sinüklein yayılımının incelenmesi amacıyla monoklonal anti-alfasinüklein antikor (ab80627, Abcam), GFP ifadesinin gösterilmesi için anti-GFP antikor (ab13970, Abcam) kullanıldı. Nöronal yoğunluğun belirlenmesi amacıyla; SN ve Str yapılarında *anti-tyrosine hydroxylase* (ab75875, Abcam) hipokampusta *anti-NeuN* (MAB 377, Merck Milipore) kullanıldı. Alfa-sinüklein, GFP ve TH antikorları 1:1000, NeuN antikor 1:200 oranında PBS çözeltisinde seyreltildi, dokular ilgili antikorlar ile 18-24 saat inkübe edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Değerler ortalama \pm standart hata (SH) olarak ifade edildi. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler Graphpad PRISM v6.0 yazılımında gerçekleştirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA *post-hoc* analizler Tukey Testi kullanılarak yapıldı. Eşlenmemiş verilerin karşılaştırılmasında *unpaired t-test* kullanıldı.

3.8. Kullanılan Solüsyonlar

Yapay beyin omurilik sıvısı; 3,51 g NaCl, 0,093 g KCl, 0,25 MgSO₄, 0,147 g CaCl₂, 1,092 g NaHCO₃, 0,098 NaH₂PO₄, 0,991 Glu, 500 mL distile su. CaCl₂ dışındaki maddeler çözündürülerek 15-20 dakika oksijenlendirildi (%95 O₂ + %5 CO₂), son olarak CaCl₂ çözeltiye eklendi.

RIPA; 89,1 mg NaCl, 10 µl triton x, 50mg DOC, 50 µl %20 SDS, 333,5 1,5M Tris pH 8.0.

Working solution; 50:1 oranında Reagent A ve Reagent B (Thermo Scientific)

20X MOPS-SDS yürütme tamponu; 5,23 gr MOPS, 2,03 gr, TrisBase, 0,5 gr SDS, 0,15 gr EDTA, 25 mL distile su. Çözeltinin pH'sının 7,7 olup olmadığı kontrol edildi. pH, 7,7±1 değil ise ayarlama yapılmayıp yeni çözelti hazırlandı.

TBST; 1000 mL distile su, 1 paket hazır Tris Buffer Saline tozu (Sigma Aldrich, T6664), 1 mL Tween-20.

Blokaj solüsyonu; TBST, %5 g/mL yağsız süt tozu.

Kemiluminensans; 1:1 oranında luminol ve peroksit (34095, Thermo Scientific)

%0,5 Tripsin stok solüsyonu; 50 mg Tripsin, 10 mL distile su. Saklama sıcaklığı; -20°C

%1 Kalsiyum klorür stok solüsyonu; 0,1 g kalsiyum klorür, 10 mL distile su. Saklama sıcaklığı; +4°C.

%0,05 Tripsin solüsyonu; 1 mL %0,5'lik tripsin stok solüsyonu, 1 mL %1'lik kalsiyum klorür stok solüsyonu, 10 mL distile su. Karışımın pH'sı, 1 N NaOH ile 7,8'e ayarlandı. +4° C'de bir ay süreyle, daha uzun süreler için -20°C'de saklandı.

DAB solüsyonu; DAB kromojeni, 1:50 oranında olacak şekilde DAB substratına eklendi (ab80436, Abcam). İyice karışmaları sağlandıktan sonra bekletilmeden, hemen kullanıldı.

Quenching solüsyonu; 1:1:8 oranında, sırasıyla; %30 H₂O₂, metanol ve TrisHCl

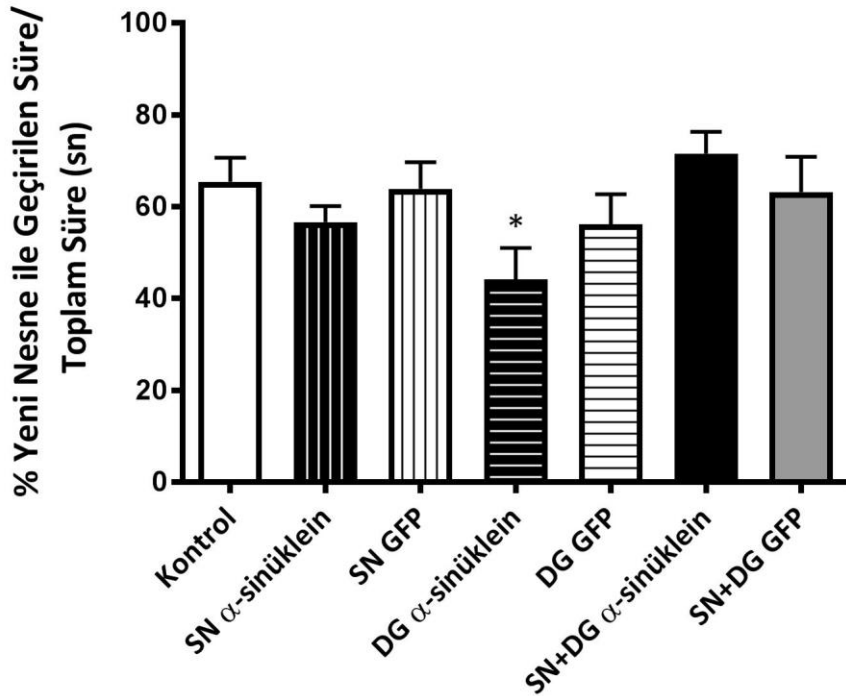
4. BULGULAR

4.1. Alfa-sinüklein ve GFP İfadesinin Kısa ve Uzun Süreli Belleğe Etkisi

Yeni nesne tanıma testinde; SN, DG ve SN+DG bölgelerine alfa-sinüklein veya GFP enjeksiyonu yapılan hayvanlar değerlendirildi.

Kısa dönem YNT testinde; SN, DG ve SN+DG bölgelerine enjeksiyon yapılan gruplarda, yeni nesne ile geçirilen zamanın kontrol grubuna göre anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.1.). Alfa-sinüklein enjekte edilen gruplarda yapılan ikili karşılaştırmalarda; DG grubunun SN+DG grubuna göre yeni nesne ile geçirdiği zaman anlamlı olarak az bulundu ($p < 0.05$, Şekil 4.1.)

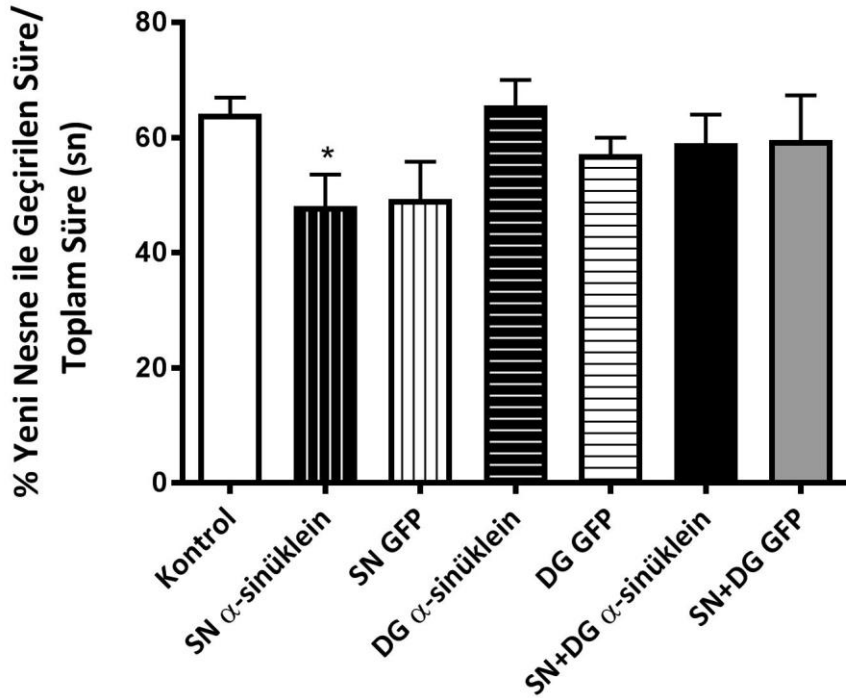
Yeni Nesne ile Geçirilen Sürenin Yeni ve Eski Nesnelere Geçirilen Toplam Süreye Oranı



Şekil 4.1. Alfa-sinüklein ve GFP ekspresyonunun, kısa dönemde, yeni ve eski nesnelere geçirilen süreler üzerindeki etkisi ($n_{\text{kontrol}}=12$, $n_{\text{SN alfa-sinüklein}}=11$, $n_{\text{SN-GFP}}=11$, $n_{\text{DG alfa-sinüklein}}=4$, $n_{\text{DG GFP}}=9$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=11$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=11$; * $p < 0.05$, SN+DG alfa-sinüklein grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi)

Uzun dönem YNT testinde; SN, DG ve SN+DG bölgelerine enjeksiyon yapılan gruplarda, yeni nesne ile geçirilen zamanın kontrol grubuna göre anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.2.). SN alfa-sinüklein grubunun ise DG alfa-sinüklein grubuna göre yeni nesne ile geçirdiği zamanın anlamlı olarak az olduğu görüldü ($p < 0.05$, Şekil 4.2.).

Yeni Nesne ile Geçirilen Sürenin Yeni ve Eski Nesnelere Geçirilen Toplam Süreye Oranı

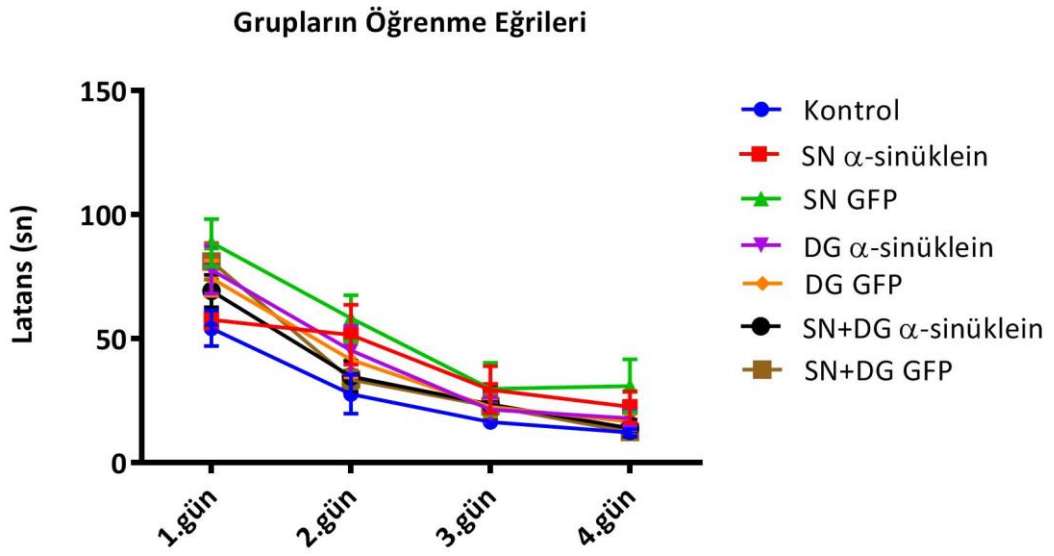


Şekil 4.2. Alfa-sinüklein ve GFP ekspresyonunun, uzun dönemde, yeni ve eski nesnelere geçirilen süreler üzerindeki etkisi ($n_{\text{kontrol}}=13$, $n_{\text{SN alfa-sinüklein}}=11$, $n_{\text{SN GFP}}=11$, $n_{\text{DG alfa-sinüklein}}=10$, $n_{\text{DG GFP}}=12$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=11$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=12$; * $p < 0.05$, DG alfa-sinüklein grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi).

4.2. Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin Öğrenme ve Uzaysal Belleğe Etkisi

Morris su labirentinde SN, DG ve SN+DG bölgelerine alfa-sinüklein veya GFP enjeksiyonu yapılan hayvanlar değerlendirildi.

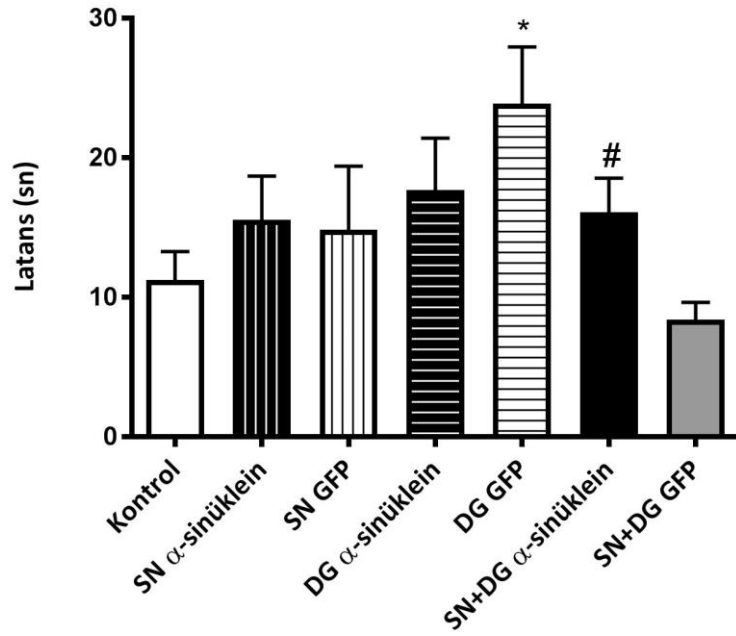
Dört gün boyunca her denemede platformu bulma sürelerinin ortalaması alınarak çizilen öğrenme eğrilerinin gruplar arasında fark göstermediği, öğrenmenin tüm gruplarda benzer olduğu görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.3. Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarının, gün bazında, platformu bulma latansları.

Beşinci gün yapılan *probe* testinde, kontrol grubuna göre, SN+DG GFP grubu hariç tüm gruplarda platformun olduğu bölgeyi bulma süresinde bir artış gözlemlendi. Bu artışın yalnız DG GFP grubunda anlamlılığa ulaştığı görüldü ($p < 0.05$, Şekil 4.4.). SN+DG alfa-sinüklein grubunda ise SN+DG GFP grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0.05$, Şekil 4.4.).

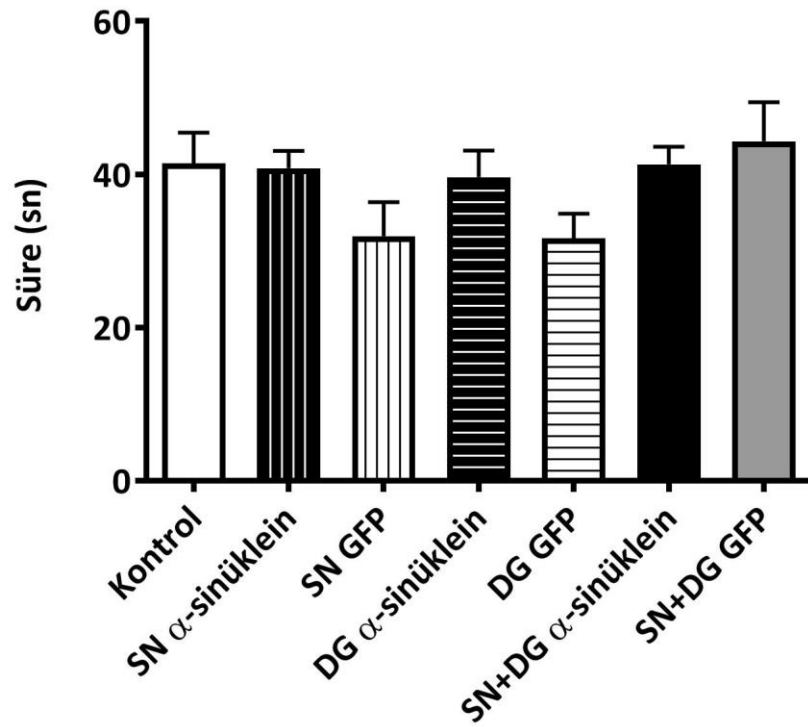
Grupların Platform Bölgesini Bulma Süreleri



Şekil 4.4. Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarının beşinci günde platform bölgesini bulma latansları. ($n_{\text{kontrol}}=12$, $n_{\text{SN alfa-sinüklein}}=11$, $n_{\text{SN GFP}}=11$, $n_{\text{DG alfa-sinüklein}}=10$, $n_{\text{DG GFP}}=12$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=11$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=12$; * $p < 0.05$, kontrol grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi; # $p < 0.05$, SN+DG GFP grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi).

Beşinci günde platformun olduğu kadranda geçirilen süreler karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara rastlanmadı (Şekil 4.5.).

Platform Bölgesinde Geçirilen Ortalama Süreler

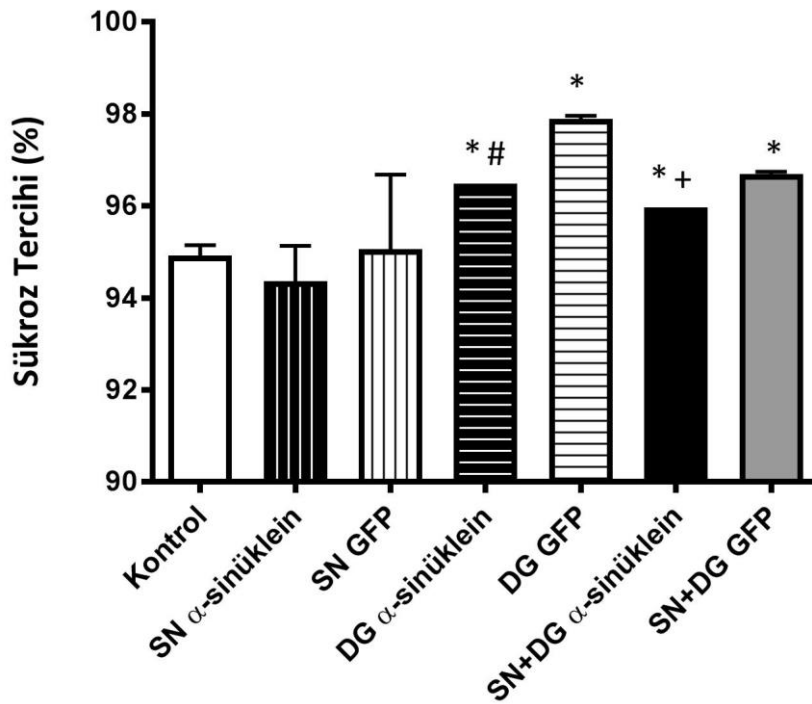


Şekil 4.5. Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarının beşinci günde platform bölgesinde geçirdikleri ortalama süreler. ($n_{\text{kontrol}}=8$, $n_{\text{SN alfa-sinüklein}}=5$, $n_{\text{SN GFP}}=5$, $n_{\text{DG alfa-sinüklein}}=4$, $n_{\text{DG-GFP}}=7$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=5$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=6$).

4.3. Alfa-sinüklein ve GFP İfadesinin Anhedoniye Etkisi

Sükroz tercih testinde SN, DG ve SN+DG bölgelerine alfa-sinüklein veya GFP enjeksiyonu yapılan hayvanlar değerlendirildi. Sükroz tüketiminin, yalnız SN'ye enjeksiyon yapılan gruplarda (SN alfa-sinüklein ve SN GFP) kontrole göre değişmediği gözlenirken, DG'ye enjeksiyon yapılan gruplarda (DG alfa-sinüklein, DG GFP, SN+DG alfa-sinüklein ve SN+DG GFP) kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$, Şekil 4.6.). DG ve SN+DG gruplarında; alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan hayvanların (DG alfa-sinüklein ve SN+DG alfa-sinüklein) DG GFP enjeksiyonu yapılanlara (DG GFP ve SN+DG GFP) göre sükroz tüketiminin daha az olduğu ve aradaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$, Şekil 4.6.).

Sükroz Tüketiminin Toplam Sıvı Tüketimine Oranı



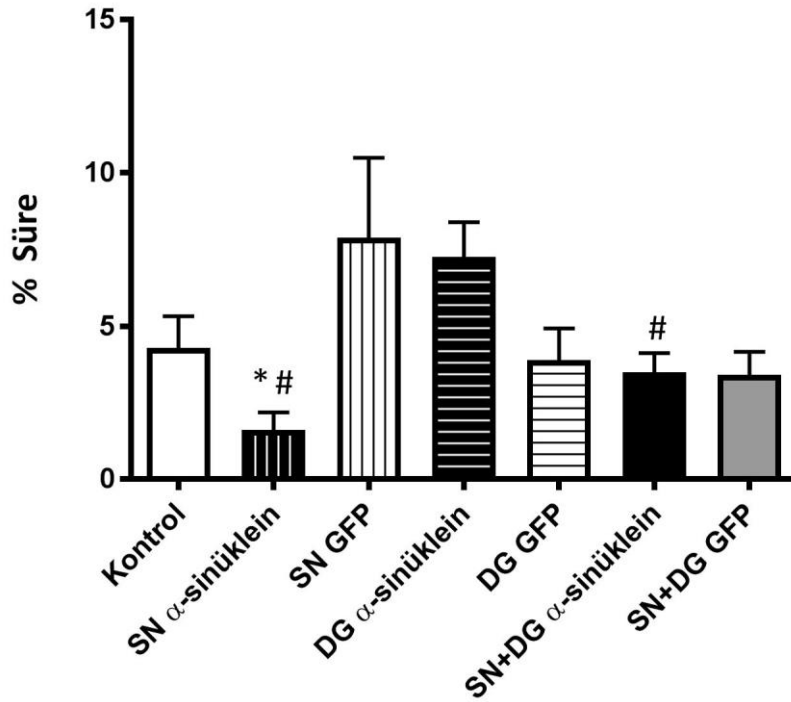
Şekil 4.6. Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarında sükroz tercih yüzdeleri. ($n_{\text{kontrol}}=14$, $n_{\text{SN alfa-sinüklein}}=6$, $n_{\text{SN-GFP}}=11$, $n_{\text{DG alfa-sinüklein}}=6$, $n_{\text{DG GFP}}=12$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=6$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=12$; * $p<0.05$, kontrol grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi; # $p<0.05$, DG GFP grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi, + $p<0.05$, SN+DG GFP grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi).

4.4. Alfa-sinüklein ve GFP İfadesinin Anksiyeteye Etkisi

Yükseltilmiş artı labirent testinde SN, DG ve SN+DG bölgelerine alfa-sinüklein veya GFP enjeksiyonu yapılan hayvanlar değerlendirildi.

SN alfa-sinüklein grubunun kontrol ve SN GFP grubuna göre açık kollarda daha az süre geçirdiği, bu sürenin SN GFP grubuna göre anlamlı olarak az olduğu gözlemlendi ($p<0.05$, Şekil 4.7). Ayrıca alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında SN ve SN+DG gruplarının DG grubuna göre açık kollarda daha az zaman geçirdiği ve aradaki farkın anlamlı olduğu gözlemlendi ($p<0.05$, Şekil 4.7.)

Açık Kollarda Geçirilen Sürenin Açık ve Kapalı Kollarda Geçirilen Toplam Süreye Oranı

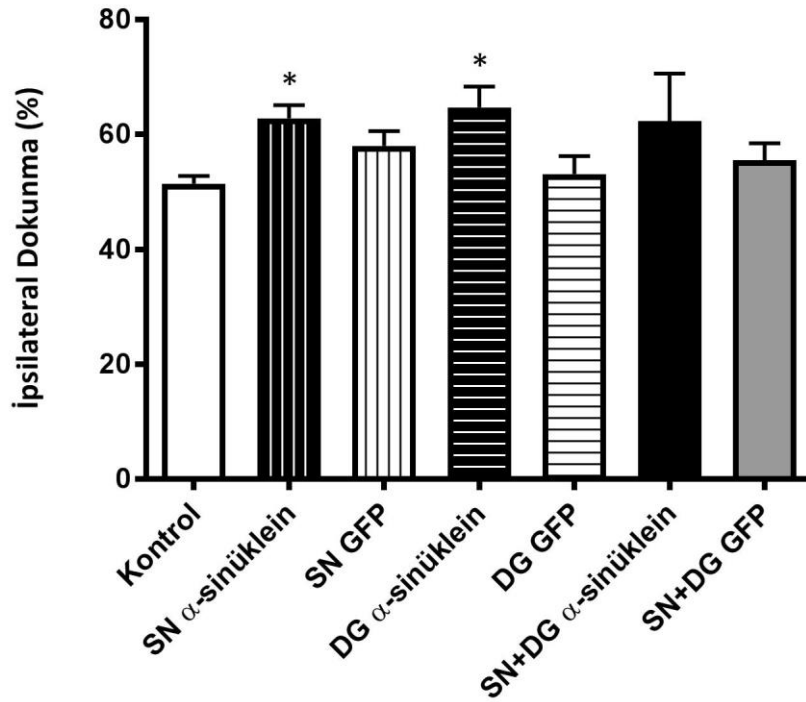


Şekil 4.7. Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarında açık kollarda geçirilen sürenin toplam süreye oranı ($n_{\text{(kontrol)}}=13$, $n_{\text{(SN alfa-sinüklein)}}=9$, $n_{\text{(SN GFP)}}=11$, $n_{\text{(DG alfa-sinüklein)}}=9$, $n_{\text{(DG GFP)}}=12$, $n_{\text{(SN+DG alfa-sinüklein)}}=11$, $n_{\text{(SN+DG GFP)}}=11$; * $p<0.05$, SN GFP grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi; # $p<0.05$, DG DG alfa-sinüklein grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi).

4.5. Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin Motor Asimetriye Etkisi

Silindir testinde SN, DG ve SN+DG bölgelerine alfa-sinüklein veya GFP enjeksiyonu yapılan hayvanlar değerlendirildi. İpsilateral (sağ ön ayak) dokunma yüzdesinin kontrol grubuna göre bütün gruplarda arttığı gözlemlendi (Şekil 4.8.). Bu artış SN alfa-sinüklein ve DG alfa-sinüklein gruplarında anlamlı bulundu ($p<0.05$, Şekil 4.8.).

İpsilateral Dokunma Sayısının Toplam Dokunma Sayısına Oranı

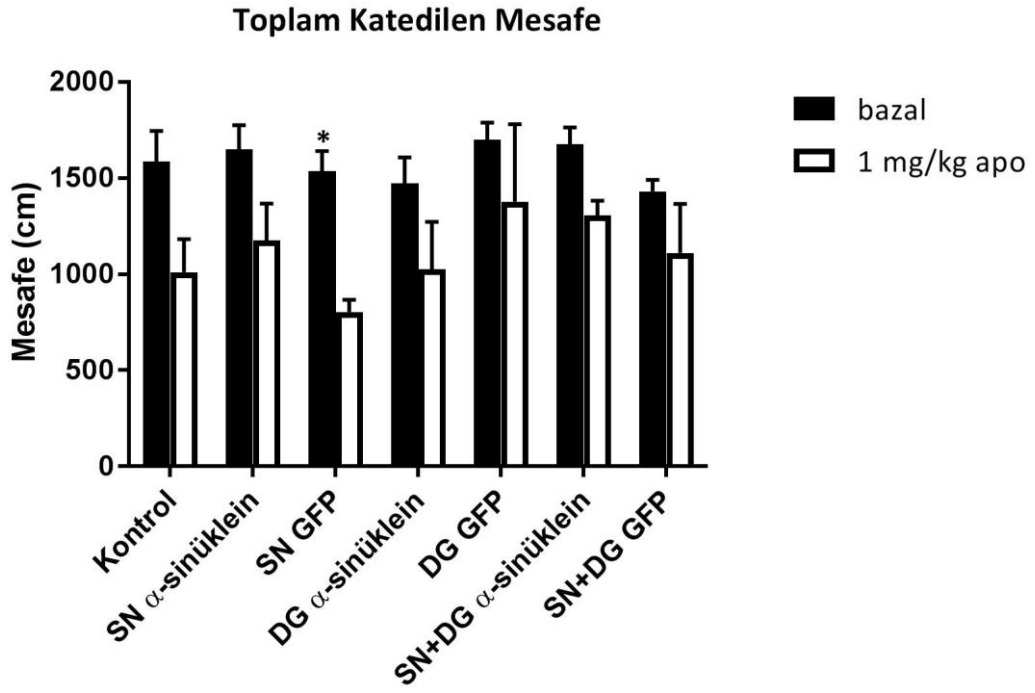


Şekil 4.8. Kontrol, alfa-sinüklein ve GFP gruplarının ipsilateral ön ayak kullanma yüzdeleri. ($n_{\text{kontrol}}=13$, $n_{\text{SN alfa-sinüklein}}=10$, $n_{\text{SN GFP}}=10$, $n_{\text{DG alfa-sinüklein}}=9$, $n_{\text{DG GFP}}=12$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=9$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=11$; * $p<0.05$, kontrol grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi).

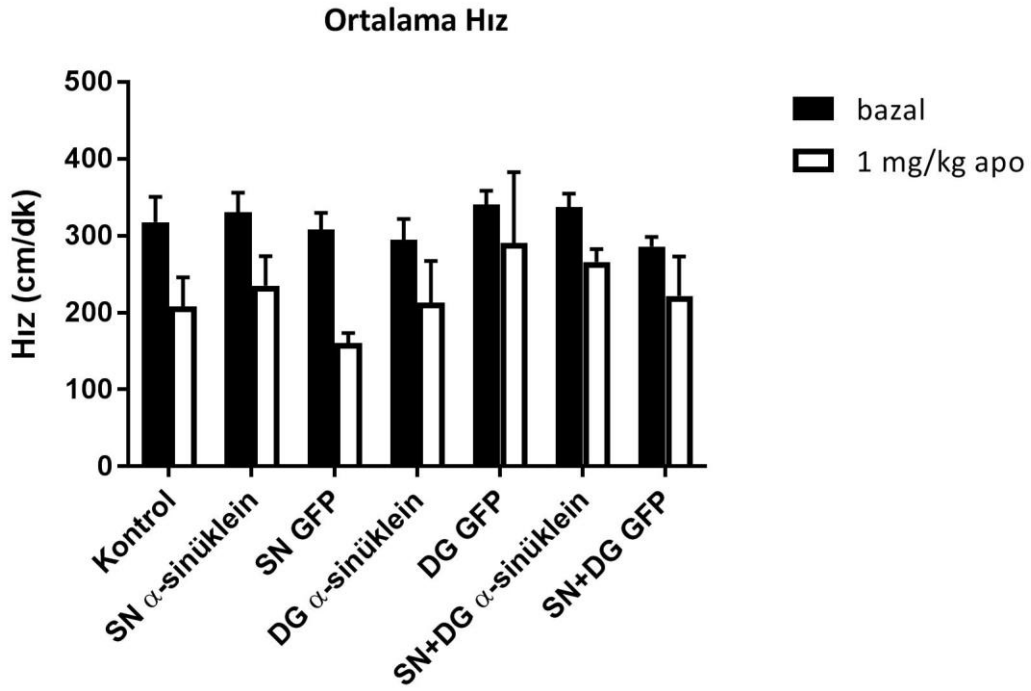
4.6. Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin Spontan Motor Aktiviteye Etkisi

Açık alan ve apomorfine indüklenen lokomotor aktivite testlerinde SN, DG ve SN+DG bölgelerine alfa-sinüklein veya GFP enjeksiyonu yapılan hayvanlar değerlendirildi. Gruplar arasında kat edilen mesafe ve hız açısından anlamlı farklılıklar gözlenmedi (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.).

Bütün gruplarda apomorfine sonrası toplam kat edilen mesafe ve ortalama hızın azaldığı görüldü (Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.). Bu azalma, sadece SN GFP grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$, Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.)



Şekil 4.9. Açık alan ve apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testlerinde grupların katettikleri toplam mesafeler (Açık alan testi için; $n_{\text{(kontrol)}}=10$, $n_{\text{(SN alfa-sinüklein)}}=11$, $n_{\text{(SN GFP)}}=11$, $n_{\text{(DG alfa-sinüklein)}}=4$, $n_{\text{(DG GFP)}}=7$, $n_{\text{(SN+DG alfa-sinüklein)}}=5$, $n_{\text{(SN+DG GFP)}}=6$; Apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testi için; $n_{\text{(kontrol)}}=10$, $n_{\text{(SN alfa-sinüklein)}}=11$, $n_{\text{(SN GFP)}}=9$, $n_{\text{(DG alfa-sinüklein)}}=6$, $n_{\text{(DG GFP)}}=4$, $n_{\text{(SN+DG alfa-sinüklein)}}=7$, $n_{\text{(SN+DG GFP)}}=7$; * $p < 0.05$, apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testine göre anlamlı, *Unpaired t-test*; apo: apomorfin).



Şekil 4.10. Açık alan ve apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testlerinde grupların ortalama hızları (Açık alan testi için; $n_{\text{(kontrol)}}=10$, $n_{\text{(SN alfa-sinüklein)}}=11$, $n_{\text{(SN GFP)}}=11$, $n_{\text{(DG alfa-sinüklein)}}=4$, $n_{\text{(DG GFP)}}=7$, $n_{\text{(SN+DG alfa-sinüklein)}}=5$, $n_{\text{(SN+DG-GFP)}}=6$; Apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testi için; $n_{\text{(kontrol)}}=10$, $n_{\text{(SN alfa-sinüklein)}}=11$, $n_{\text{(SN-GFP)}}=9$, $n_{\text{(DG alfa-sinüklein)}}=6$, $n_{\text{(DG GFP)}}=4$, $n_{\text{(SN+DG alfa-sinüklein)}}=7$, $n_{\text{(SN+DG GFP)}}=7$; apo: apomorfin).

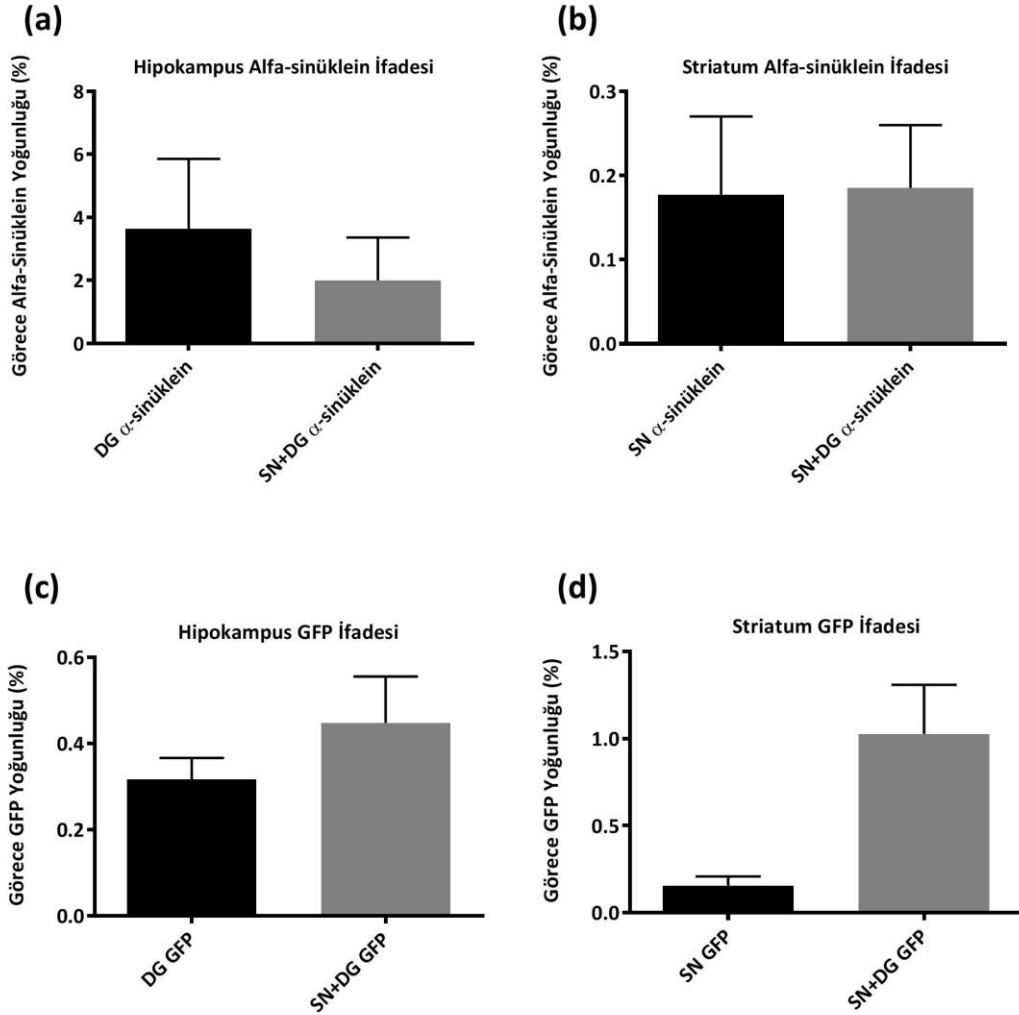
4.7. Farklı Beyin Bölgelerinde Oluşturulan Tek Taraflı Lezyonun Derecesinin Değerlendirilmesi

Tek taraflı lezyonun derecesi hayvanlara apomorfin verilmesini takiben gözlenen dönme hareketleri sayılarak değerlendirildi. Tek taraflı nigrostriatal hasarın en az %90 olduğu hayvanlarda dakikada 6 veya daha fazla kontralateral dönme gözlenmesi beklendiğinden (152) gruplardaki dönme sayıları anlamlı bulunmadı .

4.8. Farklı Beyin Bölgelerindeki Alfa-Sinüklein ve GFP İfadesinin İmmünoBlotlama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

SN, DG ve SN+DG bölgelerine AAV enjeksiyonu yapılan hayvanlarda ifade edilen alfa-sinüklein ve GFP miktarları değerlendirildi (Şekil 4.11.). SN ve SN+DG gruplarının striatum dokularında, DG ve SN+DG gruplarının hipokampus dokularında

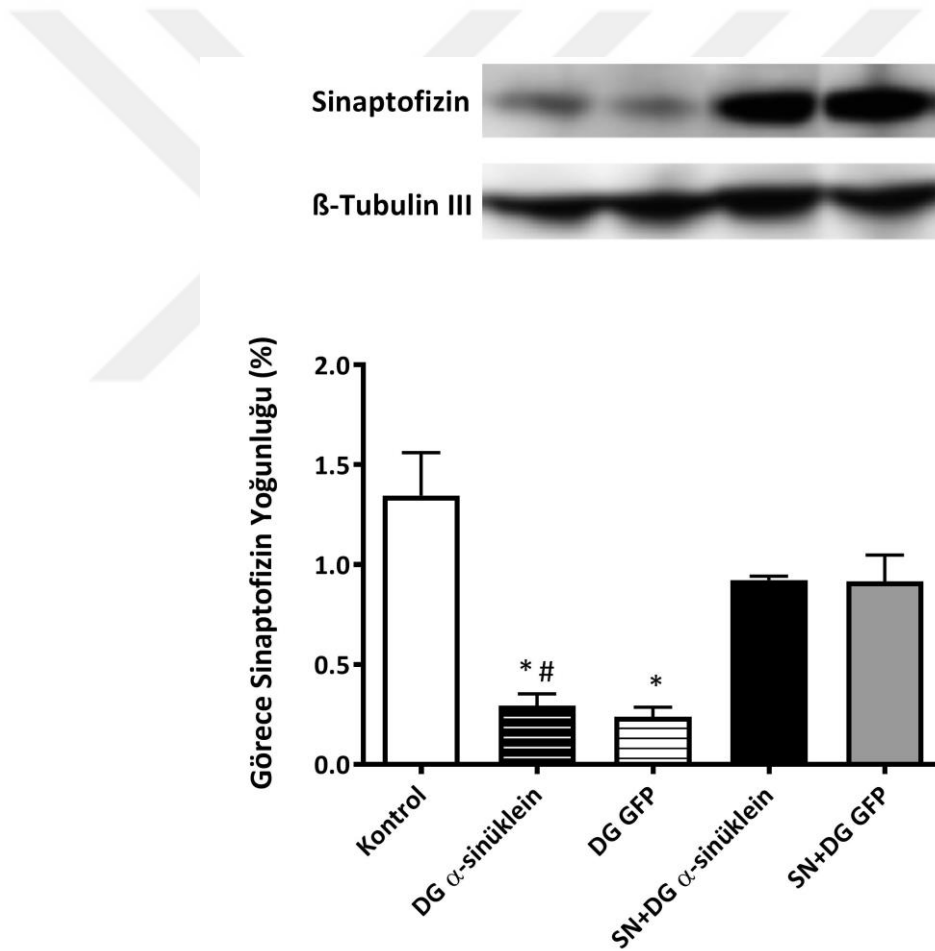
19 kDa'luk alfa-sinüklein ve 27 kDa'luk GFP bantları izlendi. Protein ifadesinin gözlenmediği hayvanlar (SN alfa-sinüklein n=1, DG alfa-sinüklein n=2, SN+DG alfa-sinüklein n= 1) davranış ve motor testlerde değerlendirme dışı bırakıldı.



Şekil 4.11. Hipokampus ve striatum yapılarında alfa-sinüklein ve GFP ifadesinin gösterilmesi **(a)** DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan gruplarda görece alfa-sinüklein yoğunluğu ($n_{(DG \text{ alfa-sinüklein})}=4$, $n_{(SN+DG \text{ alfa-sinüklein})}=5$), **(b)** SN alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan gruplarda görece alfa-sinüklein yoğunluğu ($n_{(SN \text{ alfa-sinüklein})}=5$, $n_{(SN+DG \text{ alfa-sinüklein})}=5$), **(c)** DG GFP enjeksiyonu yapılan gruplarda görece GFP yoğunluğu ($n_{(DG \text{ GFP})}=6$, $n_{(SN+DG \text{ GFP})}=6$), **(d)** SN GFP enjeksiyonu yapılan gruplarda görece GFP yoğunluğu ($n_{(SN \text{ GFP})}=6$, $n_{(SN+DG \text{ GFP})}=6$)

4.9. Farklı Beyin Bölgelerindeki Sinaptofizin Miktarlarının İmmünoiblota Yöntemi ile Değerlendirilmesi

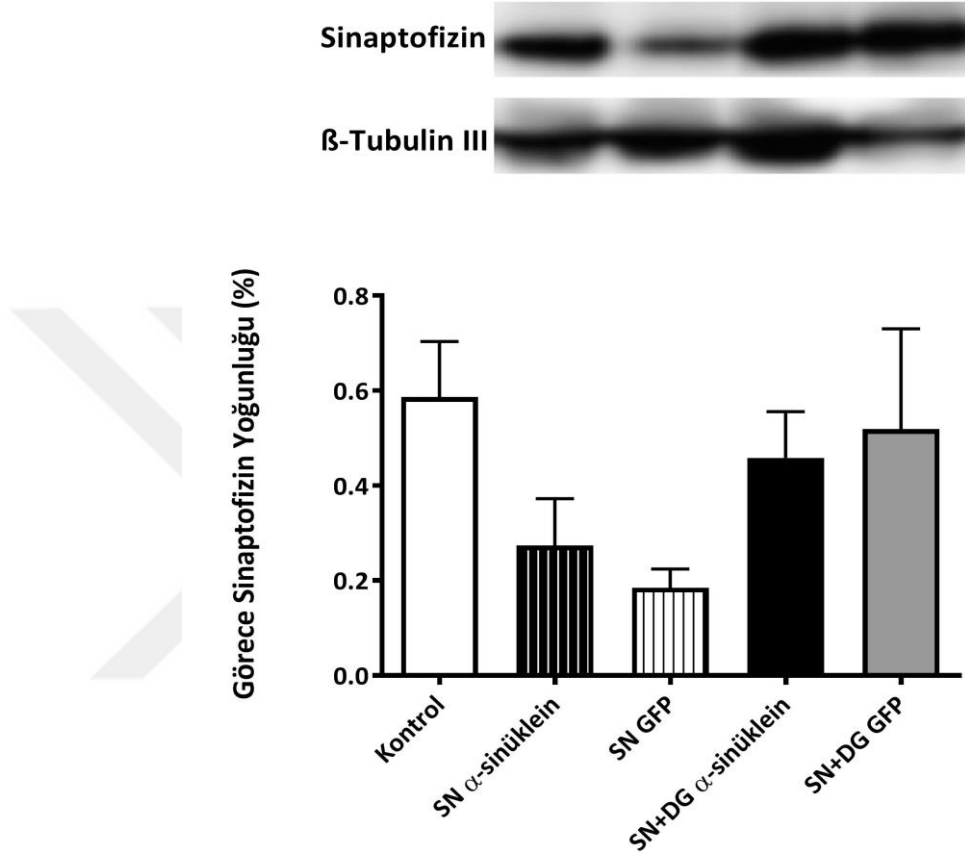
SN, DG ve SN+DG bölgelerine alfa-sinüklein ve GFP enjeksiyonu yapılan hayvanların hipokampus ve/veya striatumdaki sinaptofizin miktarları karşılaştırıldı. Hipokampus yapılarında; DG alfa-sinüklein ve DG GFP gruplarının sinaptofizin miktarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu görüldü ($p < 0.05$ Şekil 4.12.). DG ve SN+DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan hayvanlar karşılaştırıldığında ise DG grubunda SN+DG grubuna göre sinaptofizin miktarının daha az olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p < 0.05$ Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Alfa-sinüklein ve GFP ifadesinin hipokampusteki sinaptofizin miktarına etkisi ($n_{\text{kontrol}}=5$, $n_{\text{DG alfa-sinüklein}}=4$, $n_{\text{DG GFP}}=6$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=5$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=6$; $*p < 0.05$, kontrol grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey

testi; # $p < 0.05$, SN+DG alfa-sinüklein grubuna göre anlamlı, tek yönlü ANOVA, Tukey testi).

Striatum yapılarında, görece sinaptofizinin yoğunluğunun gruplar arasında değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.13.).

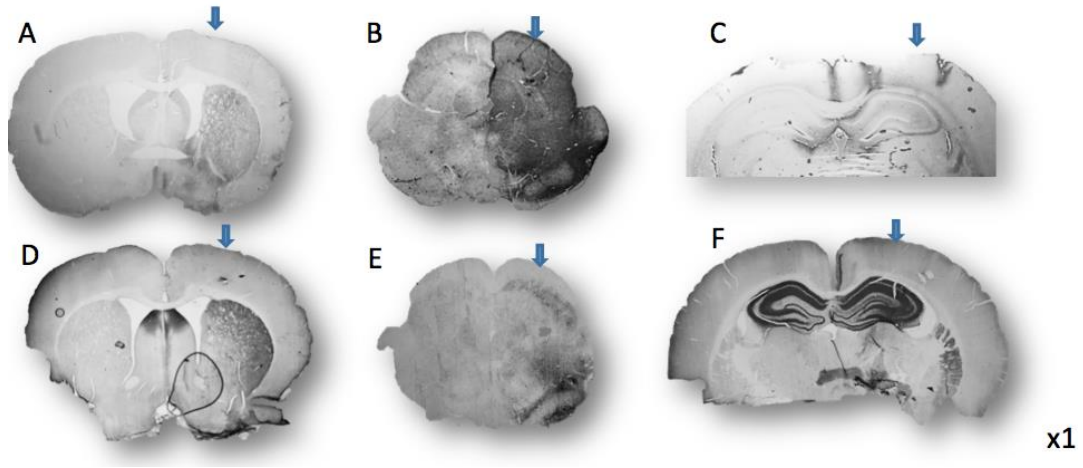


Şekil 4.13. Alfa-sinüklein ve GFP ifadesinin striatumdaki sinaptofizin miktarına etkisi ($n_{\text{kontrol}}=5$, $n_{\text{SN alfa-sinüklein}}=5$, $n_{\text{SN GFP}}=6$, $n_{\text{SN+DG alfa-sinüklein}}=5$, $n_{\text{SN+DG GFP}}=6$).

4.10. Farklı Beyin Bölgelerindeki Alfa-sinüklein ve GFP İfadelerinin

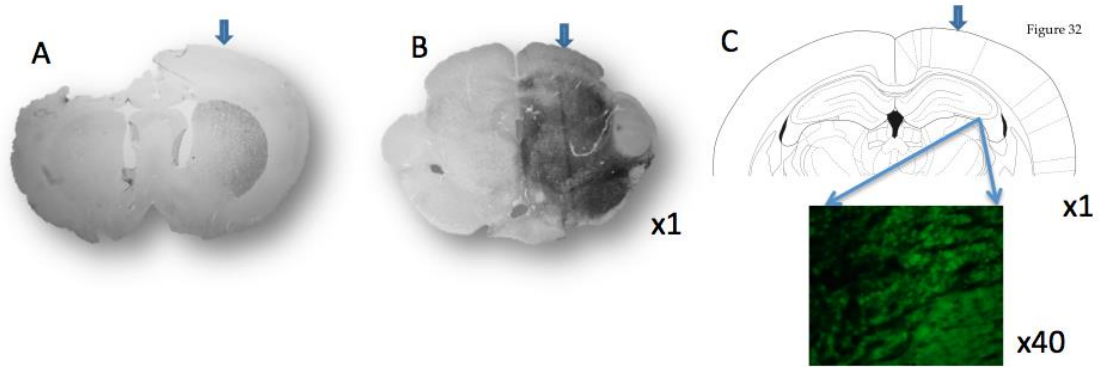
İmmünohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi

Alfa-sinüklein ifadesinin incelenmesi amacıyla; SN alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan hayvanların (SN ve SN+DG) SN ve striatularında, DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan hayvanların (DG ve SN+DG) hipokampuslerinde, immünohistokimya boyamaları yapıldı. Boyamalarda, her bir grup için alfa-sinüklein'in ifade edildiği gösterildi. Proteinin, SN ve striatum yapılarında tek taraflı, hipokampusta, kontralateral tarafta daha az olmak üzere, çift taraflı ifade edildiği gözlemlendi (Şekil 4.14.).



Şekil.14.4. Alfa-sinüklein immünohistokimyasal boyaması. (A) SN enjeksiyonu, striatum, (B) SN enjeksiyonu, substansiya nigra, (C) DG enjeksiyonu, hipokampus, (D) SN+DG enjeksiyonu, striatum, (E) SN+DG enjeksiyonu, substansiya nigra, (F) SN+DG enjeksiyonu, hipokampus. Striatum (A ve D) ve substansiya nigra (B ve E) yapılarında alfa-sinüklein'in enjeksiyon tarafında (ok ile işaretli) intakt tarafa kıyasla daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Hipokampal enjeksiyonlarda karşı hemisferde de alfa-sinüklein ifadesi gözlenmiştir (C ve F).

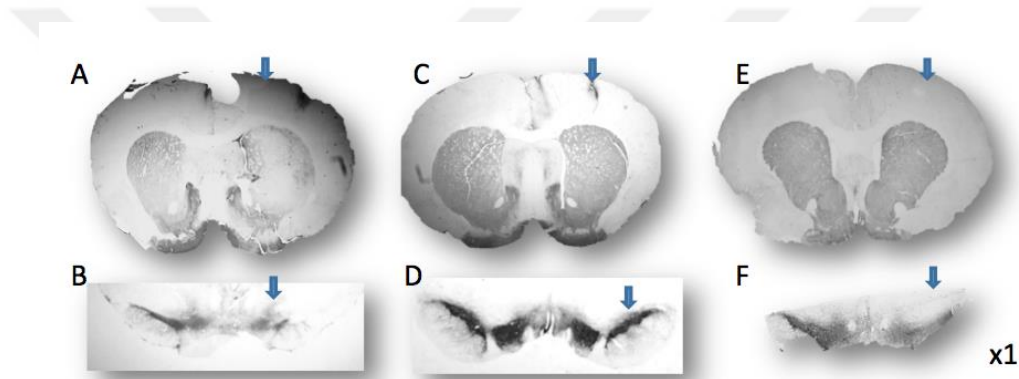
GFP ifadesinin incelenmesi amacıyla SN, striatum ve hipokampus yapılarında immunohistokimya boyamaları yapıldı, GFP ifadesi gösterildi (Şekil 4.15.).



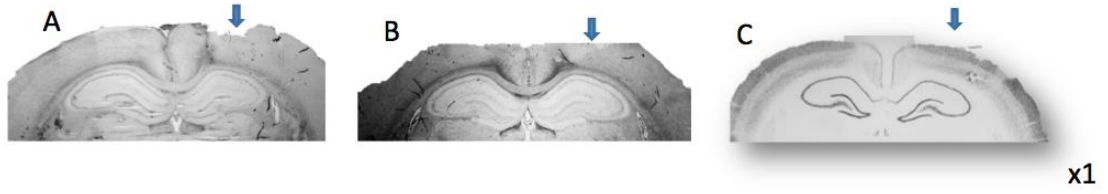
Şekil 4.15. GFP immünohistokimyasal boyaması. (A) SN enjeksiyonu, striatum, (B) SN enjeksiyonu, substansiya nigra; (C) DG enjeksiyonu grubunda, Hoechst boyaması ile GFP proteininin hipokampus CA3 bölgesinde floresans olarak görüntülenmesi. GFP tüm gruplarda sadece enjeksiyon tarafında (ok ile işaretli) gözlenmiştir.

4.11. Farklı Beyin Bölgelerindeki Nöron Kaybının İmmünohistokimya Yöntemi ile Gösterilmesi

Nöronal kaybın değerlendirilmesi amacıyla; SN alfa-sinüklein ve GFP enjeksiyonu yapılan hayvanların (SN ve SN+DG) SN ve Str yapılarında TH boyamaları, DG alfa-sinüklein ve GFP enjeksiyonu yapılan hayvanların (DG ve SN+DG) hipokampuslerinde NeuN boyaması yapıldı. Alfa-sinüklein gruplarında nöron yoğunluğunun sağlam tarafa göre; SN ve striatumda azaldığı, hipokampuste değişmediği gözlemlendi. GFP gruplarında ise, hiçbir yapıda, sağlam ve enjeksiyon yapılan taraflar arasında fark gözlenmedi (Şekil 4.16. ve 4.17).



Şekil.4.16 Tirozin hidroksilaz (TH) immünohistokimyasal boyaması. Gruplar: Alfa-sinüklein SN enjeksiyonu (A) striatum, (B) substansiya nigra; GFP SN enjeksiyonu (C) striatum, (D) substansiya nigra; Alfa-sinüklein SN+DG enjeksiyonu (E) striatum, (F) substansiya nigra. SN alfa-sinüklein grubunda; striatum (A) ve substansiya nigra (B) yapılarının TH boyamasında enjeksiyon tarafında (ok ile işaretli) intakt tarafa kıyasla gözle görülebilen bir azalma bulunmuştur. SN GFP enjeksiyonu (C ve D) ya da SN+DG alfa-sinüklein enjeksiyonu (E ve F) yapılan gruplarda ise azalma gözlenmemiştir.



Şekil.4.17. NeuN immünohistokimyasal boyaması. Gruplar: (A) Alfa-sinüklein DG enjeksiyonu, (B) GFP DG enjeksiyonu, (C) Alfa-sinüklein SN+DG enjeksiyonu. Hipokampal nöronların NeuN boyamasında; alfa-sinüklein ya da GFP'nin aşırı ifadesi ile enjeksiyon tarafında (ok ile işaretli) intakt tarafla kıyasla bir değişiklik gözlenmemiştir

5.TARTIŞMA

Parkinson hastalığı nigrostriatal dopaminerjik yolak dejenerasyonu ve alfa-sinüklein içeren Lewy cisimciklerinin varlığı ile karakterize edilmekle beraber hastalığın patolojisine ilişkin mekanizmalar tam olarak aydınlatılmış değildir. Hastalığın moleküler mekanizmalarının, ayrıca motor ve motor dışı bulgularının incelenmesi için geliştirilmiş çeşitli deneysel modeller mevcuttur. Bununla birlikte PH'de görülen ilerleyici nörodejeneratif süreci, bu süreçte ortaya çıkan moleküler ve klinik bulguları bütünüyle yansıtan bir model bulunmamaktadır. Bu doğrultuda, çalışmamızda, alfa-sinüklein'in adeno-ilişkili viral vektör (AAV) aracılığı ile substansiya nigra (SN), hipokampus dentat girus (DG) ve bu yapıların projeksiyon bölgelerinde artmış ifadesi sağlanarak Parkinson hastalığında görülen motor ve motor dışı bozuklukların incelenmesine yönelik bir hayvan modeli oluşturulması, ayrıca alfa-sinüklein'in patolojiye olan katkısının hücresel düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

Hastalığın karakteristik göstergesi olan Lewy cisimciklerinde alfa-sinüklein proteinine rastlanması (1) ve alfa-sinüklein gen multiplikasyonlarının PH ile ilişkisinin gösterilmesiyle beraber (5) proteinin aşırı ifadesine dayanan transgenik ve viral vektör aracılı modeller geliştirilmiştir. Transgenik fare modellerinde; motor bozukluklar, DA ve TH seviyelerinde azalma, striatal dopaminerjik terminallerinin kaybı, SNc ve diğer beyin bölgelerinde alfa-sinüklein agregatlarının varlığı bildirilmişse de bu sonuçlar kullanılan fare modeline ve *promoter'a* göre farklılık gösterir. Ayrıca bu modellerin çoğunda PH'dekine benzer, ilerleyici nitelikte ve selektif nigrostriatal dejenerasyon gözlenememiştir (11,110,120). Transgenik modellerin aksine, viral vektör aracılı modellerde; ilerleyici nitelikte nigral dopaminerjik nöron ölümü, striatal akson ve terminallerde patolojik değişiklikler gösterilmiştir (7–9,56,120,125,154,155). Transgenik fare modellerinde alfa-sinüklein'in beyinde yaygın ifadesi söz konusu iken, viral vektörler alfa-sinüklein'in hedeflenen beyin bölgesinde ifade edilmesine olanak tanır. Viral vektör olarak lentivirüs ya da adeno aracılı virüsler kullanılmakla beraber alfa-sinüklein geninin orta beyin dopaminerjik nöronlara transdüksiyonunda AAV vektörleri LV vektörlere göre daha etkili bulunmuştur. AAV

vektörleri ile gerçekleştirilen gen aktarımı %80 ile 90 arasında iken (7,125), LV vektörlerde bu oran %50 civarındadır (75) .

Çalışmamızda AAV vektör kullanılarak SN, DG ve SN+DG yapılarına alfa-sinüklein ve GFP enjeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Alfa-sinüklein ifadesinin hedef bölgelerde yol açtığı moleküler düzeydeki değişiklikler immunoblotlama ve immunohistokimya yöntemleri ile incelenmiştir.

İmmunoblotlama yöntemi ile; SN ve DG yapılarının projeksiyon bölgeleri olan striatum ve hipokampus CA3-1 bölgelerinde, alfa-sinüklein ve GFP ifadesi gösterilmiştir. İfade edilen alfa-sinüklein ve GFP miktarları hipokampal ve striatal dokularda farklılık göstermekle beraber bu fark kullanılan AAV6 serotipinin çeşitli dokulardaki transdüksiyon etkililiğinin değişiklik göstermesi ile açıklanabilir (11,156).

Sinaptofizin, beyinde, presinaptik veziküllerin membranlarında yerleşim gösteren, 38 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Aksonal patoloji ve sinaptik kaybın göstergesi olarak sıklıkla kullanılır. Yapısal bir protein olan sinaptofizin'in işlevleri tam olarak bilinmemekle beraber, LTP ve sinaptik plastisitede rol aldığı gösterilmiştir (157). Çalışmamızda, sinaptik kaybın değerlendirilmesi amacıyla; SN gruplarının striatumlarında, DG gruplarının hipokampuslerinde, SN+DG gruplarının hem striatum hem de hipokampuslerindeki sinaptofizin miktarları ölçülmüş, alfa-sinüklein ve GFP ifadesinin, sinaptofizin miktarını bütün gruplarda azalttığı gözlenmiştir. Alfa-sinüklein patolojisinin sinaptik kayba yol açması beklenen bir bulgu iken, GFP ifadesi ile görülen sinaptofizin kaybının GFP'nin toksik etkilerinden kaynaklanması olasıdır (158). Çalışmamızda, SN+DG alfa-sinüklein ve GFP gruplarının, hipokampus ve striatumlarında gözlenen sinaptofizin miktarlarındaki azalma, sadece SN ya da DG'ye enjeksiyon yapılan gruplara göre daha az bulunmuştur. Bu bulgu; hipokampal ve striatal yapılar arasındaki sinaptik bağlantıları, hipokampal ve striatal bellek sistemlerinin birbirleri üzerine olan etkisini düşündürmektedir. Striatal lezyonların hipokampus-aracılı, hipokampal lezyonların ise striatum-aracılı öğrenmedeki performansı artırdığı gösterilmiştir (159). Moleküler düzeyde, striatal ve hipokampal bellek sistemleri arasındaki etkileşimler tam olarak bilinmemekle beraber, birbirleri

üzerindeki etkilerinin sinaptik plastisite ve sinaptofizin ile ilişkili olduğu öne sürülebilir.

İmmunohistokimyasal yöntemler ile; SN alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan hayvanların SN ve striatumlarında, DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan hayvanların hipokampuslerinde alfa-sinüklein ifadesi gösterilmiştir. Alfa-sinüklein'in, SN ve striatum yapılarında unilateral, hipokampuste, kontralateral tarafta daha az olmak üzere, bilateral olarak ifade edildiği görülmüştür. Literatürdeki mevcut veriler, alfa-sinüklein patolojisinin, ilerleyici süreçte, nöronal bağlantılar aracılığıyla yayılım gösterdiğine işaret eder (12,79,160,161) ve çalışmamızdan elde edilen bulguları destekler. Çalışmamızda, nigrostriatal dopaminerjik kaybın göstergesi olarak, SN ve striatumda TH immunoreaktivitesi değerlendirilmiş, enjeksiyon yapılan hemisferde boyanmanın intakt hemisfere göre daha soluk olduğu gözlenmiş ancak kantitatif analizleri tamamlanamamıştır. Hipokampal kesitlerde, nöronal kaybın değerlendirilmesi amacıyla, NeuN boyaması yapılmış boyanmanın sağ ve sol hemisferlerde benzer olduğu görülmüştür. Nigrostriatal dopaminerjik nöronların fizyolojik karakteristikleri nedeniyle nörodejeneratif hasara daha yatkın oldukları bilinmektedir (162). Ayrıca alfa-sinüklein patolojisinin, morfolojik olarak benzer özellikte olan nöronlarda görüldüğü bildirilmiştir (12). Çalışmamızda nigrostriatal dopaminerjik nöronal yoğunluğun azaldığı gözlenirken hipokampuste fark gözlenmemesi farklı nöron gruplarının alfa-sinüklein patolojisine farklı düzeylerde direnç göstermesi ile açıklanabilir. Bunun yanısıra, hipokampal dokuda gözlenen sinaptofizin miktarındaki azalma, patolojinin, retrograd yayılım hipotezinde önerildiği gibi, sinaptik terminallerden nöron gövdesine doğru ilerlediğini ve henüz nöronal kayba yol açmadığını düşündürür.

AAV-aracılı deneysel modellerde, alfa-sinüklein patolojisinin, motor bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (7,9,155,163). Bununla beraber, PH'de, en az motor belirtiler kadar özürleyici olan motor dışı belirtiler de önemli yer tutar. Mevcut viral vektör aracılı modellerin çoğu orta beyin dopaminerjik nöron hasarı ve ilişkili motor bozuklukları incelemeye yöneliktir. Hastalığın motor dışı belirtilerinin, bazal ganglionlar dışında hipokampal yapılarla da ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu

doğrultuda çalışmamızda, alfa-sinüklein'in, SN, DG ve bu yapıların projeksiyon bölgelerindeki aşırı ifadesinin motor ve motor dışı davranışa olan etkisi incelenmiştir.

Hastalığın motor dışı belirtilerinden olan bilişsel disfonksiyon öğrenme ve bellek bozukluklarını da kapsar. PH'de görülen öğrenme ve bellek bozukluklarının bazal gangliyonlar dışında, frontal korteks ve hipokampal yapılarla da ilişkili olduğu düşünülmektedir (164). Bilişsel bozuklukların gözlendiği Parkinson hastalarının striatal ve frontal korteks aktivitelerinde azalma (165), kaudat nükleus ve frontal lob yapılarında dopaminerjik sistem disfonksiyonu (166), hipokampus ve prefrontal kortekslerinde atrofi görüldüğü bildirilmiştir (100,167).

Yeni nesne tanıma testi olayların ve gerçeklerin hatırlanması ile ilgili olan deklaratif belleğin incelenmesine olanak verir. Bellek disfonksiyonu olmayan hayvanların yeni nesne ile eskisine göre daha fazla vakit geçirmesi beklenir. Kullanılan deney prosedürüne göre, kısa veya uzun dönem bellek performansını, farklı koşullarda değerlendirmek mümkündür. Bu çalışmada SN, DG ve SN+DG yapılarındaki alfa-sinüklein ifadesinin deklaratif bellek üzerindeki etkisi, uzaysal komponenti olmayan koşullarda değerlendirilmiştir. Alfa-sinüklein gruplarının kısa veya uzun dönem bellek işlevlerinde, kontrol grubuna göre, istatistiksel anlamlılıkta bir fark gözlenmemiştir.

Bazal gangliyonlar ve bellek ilişkisinin YNT testi ile incelendiği literatürdeki mevcut çalışmalar; toksin-aracılı, transgenik ve monoamin depleksiyonu ilkesine dayanan PH modellerinde gerçekleştirilmiş olup alfa-sinüklein'in AAV-aracılı aşırı ifadesine dayanan modellerde yapıldığı bildirilen çalışma bulunmamaktadır (168). Bu çalışmaların bir kısmında kısa veya uzun dönem bellek bozukluklarının görülmediği bildirilmişken (169–172), bir kısmında bellek işlevlerinin bozulduğu gösterilmiştir. Bellek disfonksiyonun gözlendiği çalışmalar; nörotoksinlerin bilateral veya sistemik enjeksiyonunun (172–176) ve sistemik dopamin depleksiyonunun (177) gerçekleştirildiği PH modelleri, ya da yaygın alfa-sinüklein ifadesinin söz konusu olduğu transgenik hayvan modelleridir (178,179). Bu çalışmalardan elde edilen veriler, kliniktekilere paralel olarak, bellek disfonksiyonun bazal gangliyonlar dışında

hipokampal (164,173–176) ve kortikal yapılar (177,180), dopaminerjik sistem dışında kolinerjik ve serotoninergik sistemlerle de ilişkili olabileceğine işaret eder (178,179).

Literatürde, hipokampusun yeni nesne tanıma testindeki rolüne ilişkin farklı veriler mevcuttur. Çalışmaların büyük çoğunluğu; kalıcı hipokampal hasar oluşturulan deneysel modellerde bellek işlevlerinin korunduğuna, hipokampusün farmakolojik ajanlarla geçici inaktivasyonunun ise öğrenme ve bellek süreçlerini bozduğuna işaret eder (181). Hipokampal formasyonun ve hipokampal formasyonu çevreleyen peririnal, parahipokampal, entorinal kortekslerin öğrenme ve bellekte rol alan yapılar olduğu bilinmektedir. Bu bulgular öğrenme ve bellek süreçlerine diğer medial temporal lob yapılarının da katkıda bulunduğunu ve uzun dönemde olası kompanse mekanizmalarının devreye girdiğini düşündürmektedir (182). Medial temporal lob ve kortikal yapıların YNT testindeki rolleri incelendiğinde; öne çıkan başlıca yapıların hipokampus, medial prefrontal korteks ve peririnal korteks olduğu gösterilmiştir (183,184). Çalışmaların büyük bir kısmında uzaysal ve zamansal komponenti olmayan YNT testinde bellek işlevlerinin majör olarak peririnal korteksle ilişkili olduğu bildirilmiştir (182–186). Yine de, bu yapıların bilginin kodlanması, konsolidasyonu, depolanması ve geri çağırılması aşamalarından hangilerine, ne koşullarda katkısı olduğu tartışmalıdır (181).

Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda, hedef yapılardaki alfa-sinüklein ifadesinin, bellek fonksiyonu ile ilişkili olan medial temporal lob yapıları ve frontostriatal devrelerde yeterince nöron ölümüne yol açmadığı ileri sürülebilir. Bellek işlevlerinin korunmasında, yetersiz nöronal hasarın yanısıra, uzun dönemde gerçekleşen kompanse mekanizmalarının da rolü olabilir. Çalışmamızda YNT testi, enjeksiyonu takiben 14. haftada gerçekleştirilmiştir. Bellek disfonksiyonun; akut nörodejenerasyon ilkesine dayanan toksin-araçlı PH modellerinde gözlenmesi (172–175), ayrıca kalıcı hipokampal hasardan çok, geçici hipokampal inaktivasyon ile ilişkilendirilmesi bu görüşü destekler (181).

Bilişsel gerileme gösteren Parkinson hastalarının bir kısmında görsel-uzaysal oryantasyonun bozulduğu bildirilmiştir (164,187). Hipokampal ve striatal bellek sistemlerinin uzaysal navigasyonda rol alan yapılar olduğu bilinmektedir (188,189).

Nigrostriatal dejenerasyonun ve dopamin ile korele bir şekilde azalan hipokampal sinaptik plastisite ve LTP'nin uzaysal oryantasyon bozukluklarına neden olduğu düşünülmektedir (190). Morris su labirenti testi, deney hayvanlarında uzaysal öğrenme ve bellek performanslarının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir testtir ve farklı protokolleri mevcuttur. Hayvanların tankın etrafında distal ipuçları olmadan, görünür platforma ulaşmalarının beklendiği *cued* versiyondaki performanslarının bazal gangliyonlarla, distal ipuçlarından faydalanarak gizlenmiş platformu bulmalarının beklendiği uzaysal versiyondaki performanslarının ise hipokampusla ilişkili olduğu gösterilmiştir (164). Çalışmamızda testin uzaysal versiyon protokolü uygulanmıştır. Son gün yapılan *probe* testinde, alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan bütün hayvanların kontrol grubuna göre platform bölgesini bulma süresinin arttığı, fakat bu artışın istatistiksel önemli bir fark yaratmadığı görülmüştür. SN lezyonlarının uzaysal MST testi performansını etkilemediği birçok çalışmada gösterilmiştir (188). SN alfa-sinüklein grubunda kontrol grubuna göre fark bulunmaması literatürdeki verilerle paralellik gösterir. DG ve SN+DG alfa-sinüklein gruplarında istatistiksel anlamlılığa ulaşamaması ise kalan intakt hipokampusun öğrenme ve bellek fonksiyonlarını desteklemesi ile açıklanabilir. Hipokampusun, bilateral veya unilateral, kısmi lezyonlarının uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonlarını belli bir derecede bozduğu, MST testindeki performansın kalan intakt hipokampal doku ile korele bir şekilde değiştiği gösterilmiştir (191).

PH'de bilişsel bozuklukların yanısıra depresyon, anksiyete ve anhedoni gibi duygudurum bozuklukları da sıklıkla görülür. Anhedoni, beyinde ödül ve motivasyondan sorumlu mezolimbik ve mezokortikal yolakların disfonksiyonu ile ortaya çıkan, klinikte haz yitimi veya zevk alamama hali olarak tanımlanan, nöropsikiyatrik bir bulgudur. PH'nin olağan nörodejeneratif sürecinde azalan dopaminerjik aktivitenin bu yolaklar üzerindeki etkisinin, ayrıca frontal lob disfonksiyonun PH'de görülen anhedonin altında yatan mekanizmalar olduğu ileri sürülmüştür (192,193). Sükroz tercih testinde, anhedonik hayvanların ödül yolakları ve ilişkili sistemlerdeki disfonksiyon nedeniyle içme suyu yerine ödül niteliğinde olan sükrozlu içecekleri daha az tercih ettiği varsayılır. Bu çalışmada SN alfa-sinüklein

enjeksiyonu yapılan hayvanların sükrözlü su tercihinin kontrol grubuna göre değişmediği görülmüştür. Bu bulgu 6-OHDA, paraquat ve alfa-sinüklein'in viral vektör-aracılı aşırı ifadesinin gerçekleştirildiği PH modellerinde yapılan çalışmalarla paralellik gösterir (194). Anhedoni, nöronal düzeyde, ventral striatum ve orbitofrontal korteks yapıları ile ilişkilendirilmiştir (195). Hedonik davranışın bir göstergesi olarak kabul edilen sükröz tercihinin, bu yapılardaki dopamin eksikliğinden çok, ventral striatumun NAc'deki mü opioid (196), endokannabinoid (197) ve GABA_A (198) reseptörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu doğrultuda SN alfa-sinüklein grubunda anhedonik davranışın görülmemesi açıklanabilir. Çalışmamızda DG ve SN+DG alfa-sinüklein ve GFP gruplarının sükröz tercihinin kontrol grubuna göre arttığı, bu artışın GFP gruplarında daha fazla olduğu görülmüştür. Literatürde, hipokampal lezyonların, intrakranyal *self*-stimülasyon (199,200) ve sükröz (201) gibi ödül merkezi uyaranlarına karşı yanıtı artırdığı gösterilmiştir. NAc hipokampusten glutamaterjik girdiler alır (201). NAc'nin hipokampal glutamaterjik inervasyonunun ödül yanıtı üzerinde inhibe edici etkisi olduğu ileri sürülmüştür (199,201). Bu bilgiler doğrultusunda DG alfa-sinüklein ifadesinin, NAc'deki glutamaterjik modülasyonu bozduğu ve hedonik davranışa yol açtığı öne sürülebilir.

Anksiyete, PH'nin ileri aşamalarında motor belirtilere ikincil olarak ortaya çıkabileceği gibi, hastalığın erken dönemlerinde, motor belirtilerden önce de görülebilir. Dopaminerjik disfonksiyonun anksiyetede rolü olduğu bilinmekle beraber (202), dopamin ve anksiyete davranışı arasındaki ilişki komplekstir. Standart L-DOPA tedavisi anksiyete semptomlarını iyileştirmede yetersizdir, hatta tedavinin anksiyeteyi kötüleştirebileceği de ileri sürülmüştür (203). PH patolojisinin bazal gangliyonlara ulaşmadan önce, locus coeruleus ve raphe nucleus diğer beyin yapılarının da etkilendiği bilinmektedir (12) ve nörodejeneratif sürecin klasik motor bozuklukların ortaya çıkışından önce başladığı kabul edilir. Bu veriler PH'de görülen anksiyetede bazal gangliyonlar dışında diğer yapıların da rolü olduğunu düşündürür. Dopaminerjik, serotoninerjik ve noradrenerjik sistemler arasındaki bozulmuş dengenin PH'de görülen anksiyeteye katkısı olduğu öne sürülmüştür (203). Toksin-aracılı ve genetik PH modellerinde yapılan çalışmalar da bu görüşü destekler (202).

Anksiyetenin YAL testi ile değerlendirildiği bu çalışmaların bir kısmında anksiyete benzeri davranışların görüldüğü bildirilmişken (173,174,203,204), davranışsal değişikliğin gözlenmediği çalışmalar da mevcuttur (202). Çalışmamızda SN alfa-sinüklein grubunda gözlenen anksiyetenin kontrol grubuna göre arttığı, fakat bu artışın istatistiksel öneme ulaşmadığı görülmüştür. Bu bulgu, unilateral alfa-sinüklein ifadesinin dopaminerjik, serotoninerjik ve noradrenerjik sistemlerde anksiyete benzeri davranışlara yol açacak düzeyde bir hasara yol açmadığını düşündürür.

Anksiyete davranışının hipokampus, medial prefrontal korteks ve bazolateral amigdala yapıları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (205). Birbirleri ile anatomik ve fonksiyonel olarak bağlantılı olan bu yapıların anksiyete üzerine etkisi ayrı ayrı incelenmiş olup, hipokampal lezyonların anksiyete benzeri davranışı azalttığı gösterilmiştir (206). Mevcut veriler ventral hipokampusun anksiyetede özelleşmiş bir rolü olduğuna işaret eder. Ventral hipokampus ve ventral DG'nin bilateral lezyonlarının YAL testinde, azalmış anksiyetenin göstergesi olarak, açık kollarda geçirilen süreyi artırdığı gösterilmiştir (205,207,208). Bununla beraber, unilateral lezyonların anksiyete davranışını azaltmadığı ancak ilişkili beyin yapılarında bilateral lezyonlara benzer şekilde fizyolojik değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (205). Çalışmamızda; DG alfa-sinüklein enjeksiyonu grubunda anksiyete benzeri davranışta azalma eğilimi gözlenmiş, ancak bu azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgu, anksiyete davranışındaki azalmanın bilateral hipokampal lezyonlarla görülebildiği, unilateral lezyonların anksiyolitik etki için yetersiz olduğunun bildirildiği çalışmalarla paralellik gösterir. Bununla beraber, DG'ye tek taraflı alfa-sinüklein enjeksiyonu ile azalmış anksiyete eğilimi gözlenmesi alfa-sinüklein patolojisinin nöronlar arası yayılım hipotezini de düşündürür. Alfa-sinüklein fibrillerinin entorinal kortekse tek taraflı enjeksiyonu ile alfa-sinüklein patolojisinin bilateral olarak yayıldığı gösterilmiştir (160). Bu bulguya paralel olarak, çalışmamızda, DG alfa-sinüklein enjeksiyonu ile kontralateral hipokampusta de alfa-sinüklein ifadesi gözlenmiştir. SN+DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan grubun açık kollarda geçirdiği süre kontrol grubu ile benzerlik göstermekte olup, SN grubuna göre artmış, DG grubuna göre ise azalmıştır. Alfa-sinüklein'in SN'deki ifadesinin anksiyetede artışa,

DG'de ise azalmaya yol açtığı göz önüne alındığında alfa-sinüklein'in bu yapılardaki beraber ifadesinin anksiyete düzeyini değiştirmemesi beklenebilir.

Silindir testi, PH modellerinde unilateral nigrostriyal dopaminerjik disfonksiyonun derecesini ve buna bağlı olarak gelişen motor asimetrinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılır. Lezyon tarafının kontralateralindeki ön ayak kullanımının, hasarın büyüklüğüne bağlı olarak, azalması söz konusudur. Çalışmamızda SN, DG ve SN+DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan hayvanların, ipsilateral dokunma yüzdesinin kontrol grubuna göre arttığı, ancak bu artışın yalnızca SN ve DG gruplarında istatistiksel anlamlılığa ulaştığı görülmüştür. SN alfa-sinüklein grubunda görülen motor asimetri beklenen bir bulgudur ve daha önceki verilere paralellik gösterir (11,128,129). SN+DG deki artışın istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmaması, grup içi standart hatanın büyüklüğünden kaynaklanması olasıdır. DG alfa-sinüklein grubunda gözlenen motor asimetri ise beklenmeyen bir bulgudur ve literatürde hipokampal disfonksiyonun motor asimetriyle ilişkili olduğunu gösteren yayımlanmış veri bulunmamaktadır. Bir çalışmada toksinle indüklenen hipokampal hasarın motor koordinasyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmişse de (209), bu sonuca ilişkin makul bir açıklama mevcut değildir. Çalışmamızda, DG alfa-sinüklein grubunun yanısıra, DG GFP grubunda da motor asimetri eğilimi gözlenmiştir. Bu bulgular motor kontrolde rol alan, motor ve duyuşal korteks gibi diğer yapıların hasarını düşündürür. Duyuşal-motor kortekste ön ayak bölgesinin temsilini oluşturan bölgenin hasarı ile kontralateral ön ayak kullanımının azaldığı gösterilmiştir (149). Cerrahi işlem ve enjeksiyon sırasında oluşan hasarın motor asimetriye yol açmış olması olasıdır. Bununla beraber DG GFP grubunda görülen motor asimetri istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bulgu motor koordinasyonda hipokampusun rolü olabileceğini düşündürür. Kortikal hasardan sonra, DG'de serotonin ve NE düzeylerinin (210) ve sinaptofizin ifadesinin (211) sensori-motor işlevlerdeki düzelme ile korele bir şekilde arttığı gösterilmiş, hipokampal yapılardaki nöroplastisitenin sensori-motor performanstaki iyileşme ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (211). Çalışmamızda da DG alfa-sinüklein ve SN+DG alfa-sinüklein gruplarında sinaptofizin ifadesinin azaldığı, bu azalmanın DG alfa-sinüklein grubunda daha fazla olduğu görülmüştür. Bu veriler,

duysal-motor korteks hasarı ve DG'de azalmış nöroplastisitenin, DG alfa-sinüklein grubunda motor asimetriye neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir.

PH'nin kardinal motor belirtilerinden olan hareket azlığı/yavaşlığı dopaminerjik sistemlerin aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir (212). Spontan lokomotor davranışın dopaminerjik disfonksiyon ile olan ilişkisi toksin-aracılı ve transgenik PH modellerinin (204) yanısıra, alfa-sinüklein'in AAV-aracılı ifadesinin sağlandığı modellerde de gösterilmiştir (130,194,213). Çalışmamızda SN, DG ve SN+DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan gruplar *naïve* kontrol ve GFP kontrol grupları ile karşılaştırılmış, bazal spontan aktivitelerinin benzer olduğu görülmüştür. DG alfa-sinüklein grubunda lokomotor aktivitenin değişmemesi beklenen bir bulgudur ve DG alfa-sinüklein enjeksiyonunun nigrostriatal dopaminerjik sistemi etkilememesi ile açıklanabilir. SN ve SN+DG gruplarında istatistiksel anlamlılıkta fark bulunmaması ise yetersiz nöron kaybı ile ilişkilendirilebilir. Deneysel hayvan modellerinde yapılan spontan aktivite testlerinde, nigral dopaminerjik hücre kaybının %50-60 civarında olması motor disfonksiyonun görülmesi için eşik değerler olarak kabul edilir (11,93). Bilateral alfa-sinüklein enjeksiyonu ile, unilateral enjeksiyonlara göre, daha fazla nöron kaybı gözlenir (213). Bunun yanısıra, viral vektörlerin nigrostriatal dopaminerjik nöronlara olan tropizminin kullanılan vektörün serotipine ve *promoter*'a göre değiştiği, nöron kaybının farklılık gösterebildiği bilinmektedir (214) Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda alfa-sinüklein ekspresyonun, unilateral enjeksiyona ve/veya kullanılan AAV6 serotipine bağlı olarak, yeterli düzeyde nöronal hasara ve dopaminerjik disfonksiyona yol açmadığı öne sürülebilir.

Dopaminerjik sistemlerin motor aktivite üzerindeki etkisi çeşitli dopamin agonistleri kullanılarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda apomorfin'in düşük dozlarda motor aktivitede azalmaya, yüksek dozlarda ise artışa neden olduğu gözlenmiş (215,216), hipoaktivitenin presinaptik D2 reseptörleri, hiperaktivitenin post-sinaptik D1 reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (212,215,216). Çalışmamızda yüksek doz apomorfin (1 mg/kg) subkütan olarak uygulanmış ve lokomotor aktivitenin bütün deney gruplarında azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgu literatürdeki verilerle çelişmekle birlikte, nigrostriatal dopaminerjik yolağın tek taraflı

hasarının hayvanların dönme eğilimini artırdığı, buna bağlı olarak spontan aktivitelerinin azalmış olduğu ileri sürülebilir (120,217). Bununla birlikte lokomotor aktivitenin bütün gruplarda azaldığının gözlenmesi apomorfinle indüklenen stereotipiye düşündürür. Yüksek dozlarda apomorfinle indüklenen stereotipik davranışın lokomotor aktivitede azalmaya yol açtığı ileri sürülmüştür (217).

PH modellerinde; tek taraflı nigrostriatal lezyonun derecesi dopaminerjik ajanlar kullanılarak yapılan dönme testleri ile ölçülür (150). Lezyon tarafındaki postsinaptik dopaminerjik reseptörler denervasyona bağlı olarak aşırı duyarlı hale gelir. Buradaki reseptörlerin apomorfin gibi direkt dopamin agonistleri ile uyarılması kontralateral dönmeye yol açar. Striatal denervasyonun %90 civarında olması apomorfinle indüklenen dönme hareketi için eşik değer olarak kabul edilir (151). Dönme sayısı, apomorfin dozuna ve enjeksiyon bölgesine bağlı olarak değişmekle birlikte (151), dakikada ortalama 6 olarak bildirilmiştir (152,220). Literatürdeki verilerle karşılaştırıldığında, çalışmamızdaki SN ve SN+DG alfa-sinüklein gruplarının dönme hareketinin istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı görülmüştür. Alfa-sinüklein'in AAV-araçlı enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel PH modellerinde nörodejenerasyon, klinik tabloya benzer şekilde yavaş ve ilerleyici bir süreçte gelişir. (9,11,56,125,154). Bu veriler doğrultusunda, çalışmamızda, unilateral alfa-sinüklein enjeksiyonu ile oluşturulan nigrostriatal dejenerasyonun, eşik değere (%90 striatal denervasyon) ulaşmadığını göstermekte ve TH boyaması ile kalitatif olarak bu bulguyu desteklemektedir.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında; alfa-sinüklein'in AAV-aracılı tek taraflı enjeksiyonu ile Parkinson hastalığının motor ve motor dışı bulgularının incelenmesine yönelik bir hayvan modeli geliştirilmesi, alfa-sinüklein patolojisinin moleküler düzeyde değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda SN, DG ve bu yapıların her ikisine birlikte alfa-sinüklein enjeksiyonları gerçekleştirilmiş, alfa-sinüklein'in bu yapılarda ve bu yapıların projeksiyon bölgelerinde artmış ifadesi gösterilmiştir. Alfa-sinüklein'in, SN'ye enjeksiyonu ile tek taraflı yayıldığı gözlenirken, DG enjeksiyonu ile kontralateral hemisferde de ifade edildiği gözlenmiş, aşırı ifadesinin striatal ve hipokampal yapılardaki sinaptofizin miktarını azalttığı bulunmuştur. SN ve striatum yapılarında, dopaminerjik nöron belirteci olan TH yoğunluğunun enjeksiyon tarafında daha az olduğu, hipokampusta, nöronal işaretleyici, NeuN yoğunluğunun ise iki hemisferde de benzer olduğu gözlenmiştir.

Öğrenme ve bellek işlevlerinin, gruplar arasında anlamlı olarak değişmediği gözlenmiş, tek taraflı alfa-sinüklein enjeksiyonunun bellek fonksiyonu ile ilişkili olan medial temporal lob yapıları ve frontostriatal devrelerde yeterince nöron ölümüne yol açmaması ve uzun dönemde gelişen kompensasyon mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Hedoninin; SN alfa-sinüklein grubunda kontrol grubuna göre değişmediği, DG alfa-sinüklein enjeksiyonu yapılan gruplarda ise arttığı gösterilmiş, nigrostriatal dopaminerjik ve hipokampal glutamaterjik nöronların, hedoniye aracılık eden birincil yapı olan NAc aktivitesini farklı şekillerde modüle etmesi ile açıklanmıştır. Anksiyete düzeylerinin, SN alfa-sinüklein grubunda artma, DG grubunda azalma eğilimi gösterdiği, SN+DG alfa-sinüklein grubunda ise kontrol grubu ile benzer olduğu bulunmuştur. Anksiyetede artış ve azalma istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, alfa-sinüklein'in nigrostriatal ve hipokampal yapılardaki ifadesinin anksiyete üzerinde farklı etkileri olması ile ilişkilendirilmiştir.

Tek taraflı alfa-sinüklein enjeksiyonunun motor asimetriye yol açtığı silindir testi ile gösterilmiştir. Spontan motor aktivitenin ve apomorfinle indüklenen dönmenin ise gruplar arasında anlamlı olarak değişmediği gözlenmiş, tek taraflı alfa-sinüklein enjeksiyonunun, bu testlerle ölçülen motor becerilerde disfonksiyona neden olacak

düzyeyde hasar oluşturmaması ile açıklanmıştır. Apomorfinle indüklenen lokomotor aktivite testinde bütün grupların spontan motor aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Literatürdeki verilere göre beklenmeyen bir bulgu olan bu azalmanın apomorfinle indüklenen stereotipiye bağılı olarak ortaya çıktığı öne sürülebilir.

Parkinson hastalığının kardinal motor belirtileri bazal gangliyonların disfonksiyonuna bağılı olarak ortaya çıkarken, motor dışı belirtileri bazal gangliyonlar dışında diğey yapılarla da ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda alfa-sinüklein'in SN, DG ve bu yapıların her ikisine birlikte, tek taraflı enjeksiyonu sonucu gözlenen motor ve motor-dışı bulgular değerlendirilmiş, moleküler düzeyde meydana gelen patolojik değişiklikler incelenmiştir. Elde edilen bulgular alfa-sinüklein'in tek taraflı enjeksiyonun kısmi nörodejenerasyona yol açtığını ve motor dışı belirtilerin gözlenmesi için yetersiz olduğunu düşündürür. Bununla beraber, bu veriler gelecekteki benzer çalışmalara temel oluşturabilir. Hastalığın motor ve motor-dışı belirtilerinin, alfa-sinüklein'in SN ve DG yapılarına bilateral enjeksiyonu ile oluşturulacak deneysel modellerde de incelenmesi yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-Synuclein in Lewy Bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839–40.
2. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the Alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*. 1997;276(5321):2045–7.
3. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro Mutation in the Gene Encoding Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *Nat Genet*. 1998;18(2):106–8.
4. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, et al. The New Mutation, E46K, of Alpha-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia. *Ann Neurol*. 2004;55(2):164–73.
5. Devine MJ, Gwinn K, Singleton A, Hardy J. Parkinson's disease and Alpha-Synuclein Expression. *Mov Disord*. 2011;26(12):2160–8.
6. Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, Houlden H, Schapira AH. A Novel Alpha-Synuclein Missense Mutation in Parkinson Disease. *Neurology*. 2013 Mar 12;80(11):1062-4.
7. Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, et al. Parkinson-like Neurodegeneration Induced by Targeted Overexpression of Alpha-Synuclein in the Nigrostriatal System. *J Neurosci*. 2002;22(7):2780–91.
8. Klein RL, King MA, Hamby ME, Meyer EM. Dopaminergic Cell Loss Induced by Human A30P α -Synuclein Gene Transfer to the Rat Substantia Nigra. *Hum Gene Ther*. 2002;13(5):605–12.
9. Eslamboli A, Romero-Ramos M, Burger C, Bjorklund T, Muzyczka N, Mandel RJ, et al. Long-term Consequences of Human Alpha-Synuclein Overexpression in the Primate Ventral Midbrain. *Brain*. 2007;130(3):799–815.
10. Theodore S, Cao S, McLean PJ, Standaert DG. Targeted Overexpression of Human α -Synuclein Triggers Microglial Activation and an Adaptive Immune Response in a Mouse Model of Parkinson Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67(12):1149–58.
11. Ulusoy A, Decressac M, Kirik D, Björklund A. Viral Vector-mediated Overexpression of Alpha-Synuclein as a Progressive Model of Parkinson's Disease. Vol. 184, *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V.; 2010. 89-111 p.
12. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: Possible Routes by Which Vulnerable Neuronal Types May Be Subject to Neuroinvasion by an Unknown Pathogen. *J Neural Transm*. 2003;110(5):517–36.
13. Dexter DT, Jenner P. Parkinson Disease: From Pathology to Molecular Disease Mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2013;62:132–44.
14. Calabresi P, Castrioto A, Di Filippo M, Picconi B. New Experimental and Clinical

- Links Between the Hippocampus and the Dopaminergic System in Parkinson's Disease. *Lancet Neurol.* 2013;12(8):811–21.
15. Parkinson James. Essay on the Shaking Palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002;14:(2):223–36.
 16. Parent M, Parent A. Substantia Nigra and Parkinson's Disease: A Brief History of Their Long and Intimate Relationship. *Can J Neurol Sci.* 2010;37(3):313–9.
 17. Rodrigues E Silva AM, Geldsetzer F, Holdorff B, Kielhorn FW, Balzer-Geldsetzer M, Oertel WH, et al. Who Was the Man Who Discovered the Lewy Bodies? *Mov Disord.* 2010;25(12):1765–73.
 18. Goetz CG, Chmura T a, Lanska DJ. The History of Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 2001;16(1):156–61.
 19. Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's Disease. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(1):14–26.
 20. Middleton F, Strick PL. Basal Ganglia and Cerebellar Loops. *Brain Res Rev.* 2000;31:236–50.
 21. Tekin S, Cummings JL. Frontal Subcortical Neuronal Circuits and Clinical Neuropsychiatry: An Update. 2002;53:647–54.
 22. Björklund T. Gene Therapy by Enzyme Replacement for Parkinson's Disease Optimization of Continuous DOPA Delivery and Development of a Candidate Vector for Clinical Application. Lund University; 2009.
 23. Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional Significance of the Cortico-subthalamo-pallidal "Hyperdirect" Pathway. *Neurosci Res.* 2002;43(2):111–7.
 24. Freeze BS, Kravitz A V., Hammack N, Berke JD, Kreitzer AC. Control of Basal Ganglia Output by Direct and Indirect Pathway Projection Neurons. *J Neurosci.* 2013;33(47):18531–9.
 25. Cui G, Jun SB, Jin X, et al. Concurrent Activation of Striatal Direct and Indirect Pathways During Action Initiation. *Nature.* 2013;494(7436):238-242.
 26. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and Indirect Pathways of Basal Ganglia: A Critical Reappraisal. *Nat Neurosci.* 2014;17(8):1022–30.
 27. Manns JR, Eichenbaum H. Evolution of the Hippocampus. Elsevier, Editor. *Evolution of Nervous Systems: A Comprehensive Reference.* London; 2007.
 28. Bartesaghi R, Migliore M, Gessi T. Input-output Relations in the Entorhinal cortex-dentate-hippocampal System: Evidence for a Non-linear Transfer of Signals. *Neuroscience.* 2006;142(1):247–65.
 29. Lavenex P, Amaral DG. Hippocampal-neocortical Interaction: A Hierarchy of Associativity. *Hippocampus* 2000;10(4):420–30.
 30. Burwell RD. The Parahippocampal Region: Corticocortical Connectivity. *Ann N Y Acad Sci* 2006;911(1):25–42.

31. Tulving E. Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annu Rev Psychol* 2002;53(1):1–25.
32. Bird CM, Burgess N. The Hippocampus and Memory: Insights From Spatial Processing. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(3):182–94
33. Spiers HJ. Hippocampal Formation. 2nd ed. *Encyclopedia of Human Behavior*. Elsevier Inc.; 2012.
34. Koehl M, Abrous DN. A New Chapter in the Field of Memory: Adult Hippocampal Neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011;33(6):1101–14.
35. Maguire E a, Burgess N, O’Keefe J. Human Spatial Navigation: Cognitive Maps, Sexual Dimorphism, and Neural Substrates. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9(2):171–7.
36. Spiers HJ, Burgess N, Hartley T, Vargha-Khadem F, O’Keefe J. Bilateral Hippocampal Pathology Impairs Topographical and Episodic Memory But Not Visual Pattern Matching. *Hippocampus*. 2001;11(6):715–25.
37. O’Keefe J, Dostrovsky J. Short Communications The hippocampus As a Spatial Map: Preliminary Evidence From Unit Activity in the Freely Moving Rat. *Brain Res*. 1971;34:171–5.
38. J.O’Keefe and L.Nadel. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press:1978.
39. Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a Spatial Map in the Entorhinal Cortex. *Nature* 2005;436(7052):801–6.
40. Burgess N, Maguire E a, O’Keefe J. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory Neuron. 2002;35(4):625–41.
41. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: A Neuron-specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal. *J Neurosci*. 1988;8(8):2804–15.
42. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, et al. Molecular Cloning of cDNA Encoding an Unrecognized Component of Amyloid in Alzheimer Disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90(23):11282–6.
43. Tobe T, Nakajo S, Tanaka A, Mitoya A, Omata K, Nakaya K, et al. Cloning and Characterization of the cDNA Encoding a Novel Brain-Specific 14-kDa Protein. *J Neurochem*. 1992; 59(5):1624–9.
44. Ji H, Liu YE, Jia T, Wang M, Liu J, Xiao G, et al. Identification of a Breast Cancer-specific Gene, BCSG1, by Direct Differential cDNA Sequencing. *Cancer Res*. 1997;57(4):759–64.
45. Breydo L, Wu JW, Uversky VN. Alpha-synuclein Misfolding and Parkinson’s Disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2012;1822(2):261–85.
46. Recchia A, Debetto P, Negro A, Guidolin D, Skaper SD, Giusti P. Alpha-synuclein and Parkinson’s Disease. *FASEB J*. 2004;18(6):617–26.

47. Benskey MJ, Perez RG, Manfredsson FP. The Contribution of Alpha-synuclein to Neuronal Survival and Function - Implications for Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 2016;137(3):331–59.
48. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. The Many Faces of Alpha-synuclein: From Structure and Toxicity to Therapeutic Target. *Nat Rev Neurosci.* 2012;14(1):38–48.
49. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT. Accelerated Publication NACP , A Protein Implicated in Alzheimer's Disease and Learning , Is Natively Unfolded. *Biochemistry.* . 1996;35(43):13709–15.
50. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Browne G. Conformational Properties of Alpha-synuclein in Its Free and Lipid-associated States. *J Mol Biol.* 2001;307(4):1061–73.
51. Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, et al. Biophysical Properties of the Synucleins and Their Propensities to Fibrillate: Inhibition of Alpha-synuclein Assembly by Beta- and Gama-synucleins. *J Biol Chem.* 2002;277(14):11970–8.
52. Sibille N, Bernadó P. Structural Characterization of Intrinsically Disordered Proteins by the Combined Use of NMR and SAXS. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(5):955–62.
53. Zhu M, Fink AL. Lipid Binding Inhibits Alpha-synuclein Fibril Formation. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16873–7.
54. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, et al. Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation In Mice Lacking Alpha-synuclein. *J Neurosci.* 2002;22(20):8797–807.
55. Liu S, Ninan I, Antonova I, Battaglia F, Trinchese F, Narasanna A, et al. Alpha-synuclein Produces a Long-lasting Increase in Neurotransmitter Release. *EMBO J.* 2004;23(22):4506–16.
56. St Martin JL, Klucken J, Outeiro TF, Nguyen P, Keller-McGandy C, Cantuti-Castelvetri I, et al. Dopaminergic Neuron Loss and Up-regulation of Chaperone Protein mRNA Induced by Targeted Over-expression of Alpha-synuclein in Mouse Substantia Nigra. *J Neurochem.* 2007;100(6):1449–57.
57. Thayanidhi N, Helm JR, Nycz DC, Marvin B, Yingjian C, Liang Y, et al. Alpha-Synuclein Delays Endoplasmic Reticulum (ER)-to-Golgi Transport in Mammalian Cells by Antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell.* 2010;21:1850–63.
58. Scott D, Roy S. Alpha-Synuclein Inhibits Intersynaptic Vesicle Mobility and Maintains Recycling-Pool Homeostasis. *J Neurosci.* 2012 Jul 25;32(30):10129–35.
59. Kanaan NM, Manfredsson FP. Loss of Functional Alpha-synuclein: A Toxic Event

- in Parkinson's disease? *J Parkinsons Dis.* 2012;2(4):249–67.
60. Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ. A Role for Alpha-synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. *J Neurosci.* 2002;22(8):3090–9.
 61. Tehranian R, Montoya SE, Van Laar AD, Hastings TG, Perez RG. Alpha-synuclein Inhibits Aromatic Amino Acid Decarboxylase Activity in Dopaminergic Cells. *J Neurochem.* 2006;99(4):1188–96.
 62. Larsen KE, Schmitz Y, Troyer MD, Mosharov E, Dietrich P, Quazi AZ, et al. - Synuclein Overexpression in PC12 and Chromaffin Cells Impairs Catecholamine Release by Interfering with a Late Step in Exocytosis. *J Neurosci.* 2006;26(46):11915–22.
 63. Lundblad M, Decressac M, Mattsson B, Bjorklund A. Impaired Neurotransmission Caused by Overexpression of Alpha-synuclein in Nigral Dopamine Neurons. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(9):3213–9.
 64. Chadchankar H, Ihalainen J, Tanila H, Yavich L. Decreased Reuptake of Dopamine in the Dorsal Striatum in the Absence of Alpha-synuclein. *Brain Res.* 2011;1382:37–44.
 65. Burré J. The Synaptic Function of Alpha-synuclein. *J Parkinson's Dis.* 2015;5(4):699–713.
 66. Wales P, Lázaro DF, Pinho R, Outeiro TF. Limelight on Alpha-synuclein: Pathological and Mechanistic Implications in Neurodegeneration. *J Parkinson's Dis.* 2013;3(4):415–59.
 67. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The Function of Alpha-synuclein. *Neuron.* 2013;79(6):1044–66.
 68. Quilty MC, King AE, Gai WP, Pountney DL, West AK, Vickers JC, et al. Alpha-synuclein is Upregulated in Neurones in Response to Chronic Oxidative Stress and is Associated with Neuroprotection. *Exp Neurol.* 2006;199(2):249–56.
 69. Zhu M, Qin ZJ, Hu D, Munishkina LA, Fink AL. Alpha-Synuclein Can Function As an Antioxidant Preventing Oxidation of Unsaturated Lipid in Vesicles. *Biochemistry.* 2006;45(26):8135–42.
 70. Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ. Protein Degradation Pathways in Parkinson's Disease: Curse or Blessing. *Acta Neuropathol.* 2012; 124(2):153–72.
 71. Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28(1):24–30.
 72. Vera Dias, Eunsung Junn MMM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J Park Dis.* 2014;3(4):461–91.
 73. Ambrosi G, Cerri S, Blandini F. A Further Update on the Role of Excitotoxicity in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J Neural Transm.* 2014;121(8):849–59.

74. Fujita KA, Ostaszewski M, Matsuoka Y, Ghosh S, Glaab E, Trefois C, et al. Integrating Pathways of Parkinson's Disease in a Molecular Interaction Map. *Mol Neurobiol.* 2014;49(1):88–102.
75. Lo Bianco C, Ridet J-L, Schneider BL, Déglon N, Aebischer P. α -Synucleinopathy and Selective Dopaminergic Neuron Loss in a Rat Lentiviral-Based Model of Parkinson's Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2002;99(16):10813-10818.
76. Vilar M, Chou H-T, Luhrs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, et al. The Fold of Alpha-synuclein Fibrils. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(25):8637–42.
77. Breydo L, Uversky VN. Structural, Morphological, and Functional Diversity of Amyloid Oligomers. *FEBS Lett* 2015;589(19):2640–8.
78. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, et al. Pathological Alpha-Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice. *Science.* 2012;338(6109):949–53.
79. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, et al. Prion-like Spreading of Pathological Alpha-synuclein in Brain. *Brain.* 2013;136(4):1128–38.
80. Recasens A, Dehay B, Bové J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Pérez-Villalba A, et al. Lewy Body Extracts From Parkinson Disease Brains Trigger α -synuclein Pathology and Neurodegeneration in Mice and Monkeys. *Ann Neurol.* 2014;75(3):351–62.
81. Osterberg VR, Spinelli KJ, Weston LJ, Luk KC, Woltjer RL, Unni VK. Progressive Aggregation of Alpha-Synuclein and Selective Degeneration of Lewy Inclusion-Bearing Neurons in a Mouse Model of Parkinsonism. *Cell Rep.* 2015;10(8):1252–60.
82. Gosavi N, Lee HJ, Lee JS, Patel S, Lee SJ. Golgi Fragmentation Occurs in the Cells with Prefibrillar Alpha-synuclein Aggregates and Precedes the Formation of Fibrillar Inclusion. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48984–92.
83. Rieker C, Dev KK, Lehnhoff K, Barbieri S, Ksiazek I, Kauffmann S, et al. Neuropathology in Mice Expressing Mouse Alpha-synuclein. *PLoS One.* 2011;6(9).
84. Conway KA, Lee S-J, Rochet J-C, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT. Acceleration of Oligomerization, Not Fibrillization, Is A Shared Property of Both Alpha-synuclein Mutations Linked to Early-Onset Parkinson's Disease: Implications for Pathogenesis and Therapy. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(2):571–6.
85. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, et al. In Vivo Demonstration That Alpha-synuclein Oligomers Are Toxic. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(10):4194–9.
86. Villar-Piqué A, Lopes da Fonseca T, Outeiro TF. Structure, Function and Toxicity

- of Alpha-synuclein: the Bermuda Triangle in Synucleinopathies. *J Neurochem*. 2016;139:240–55.
87. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease. *Neurobiol Aging*. 2003 Mar-Apr;24(2):197-211
 88. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's Disease: A Dual-Hit Hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007;33(6):599–614.
 89. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Olanow CW, Freeman TB. Transplanted Dopaminergic Neurons Develop PD Pathologic Changes: A Second Case Report. *Mov Disord*. 2008;23(16):2303–6.
 90. Li J-Y, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy Bodies in Grafted Neurons in Subjects with Parkinson's Disease Suggest Host-to-Graft Disease Propagation. *Nat Med*. 2008;14(5):501–3.
 91. Visanji NP, Brooks PL, Hazrati L-N, Lang AE. The Prion Hypothesis in Parkinson's Disease: Braak to the Future. *Acta Neuropathol Commun*. 2013;1(1):2.
 92. Herva ME, Spillantini MG. Parkinson's Disease as a Member of Prion-like Disorders. *Virus Res*. 2015;207:38–46.
 93. De La Fuente-Fernández R. Imaging of Dopamine in PD and Implications for Motor and Neuropsychiatric Manifestations of PD. *Front Neurol*. 2013;4 (July):1–6.
 94. Chaudhuri KR, Quinn NP. What Are the Non-motor Symptoms of Parkinson's Disease? Chaudhuri KR, Tolosa E, Schapira AH V., Poewe W, editors. *Non Motor Symptoms of Parkinson's Disease*. Second Edi. Oxford University Press; 2014.
 95. Todorova A, Jenner P, Ray Chaudhuri K. Non-motor Parkinson's: Integral to Motor Parkinson's, Yet Often Neglected. *Pract Neurol*. 2014;14(5):310–22.
 96. Bonelli RM, Cummings JL. Frontal-Subcortical Circuitry and Behavior. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2007;9(2):141-151.
 97. De La Fuente-Fernández R. Frontostriatal Cognitive Staging in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*. 2012;2012.
 98. Riekkinen PJ, Kejonen K, Laakso MP, Soininen H, Partanen K, Riekkinen M. Hippocampal Atrophy is Related to Impaired Memory, But Not Frontal Functions in Non-demented Parkinson's Disease Patients. *Neuroreport* 1998;9(June):1507–11.
 99. Camicioli R, Moore MM, Kinney A, Corbridge E, Glassberg K, Kaye J a. Parkinson's Disease is Associated with Hippocampal Atrophy. *Mov Disord*. 2003;18(7):784–90.
 100. Bruck A. Hippocampal and Prefrontal Atrophy in Patients with Early Non-demented Parkinson's Disease is Related to Cognitive Impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004;75(10):1467–9.

101. Jokinen P, Scheinin N, Aalto S, Någren K, Savisto N, Parkkola R, et al. [11C]PIB, [18F]FDG-PET and MRI Imaging in Patients with Parkinson's Disease with and without Dementia. *Park Relat Disord*. 2010;16(10):666–70.
102. Bliss TVP, Lømo T. Long-lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant path. *J Physiol*. 1973;232(2):331–56.
103. Bliss T, Collingridge G. A Synaptic Model of Memory: Long-term Potentiation in the Hippocampus. *Nature*. 1993;361:31–9.
104. Costa C, Sgobio C, Siliquini S, Tozzi A, Tantucci M, Ghiglieri V, et al. Mechanisms Underlying the Impairment of Hippocampal Long-term Potentiation and Memory in Experimental Parkinson's Disease. *Brain*. 2012;135(6):1884–99.
105. Diogenes MJ, Dias RB, Rombo DM, Vicente Miranda H, Maiolino F, Guerreiro P, et al. Extracellular Alpha-Synuclein Oligomers Modulate Synaptic Transmission and Impair LTP Via NMDA-Receptor Activation. *J Neurosci* 2012;32(34):11750–62.
106. Marxreiter F, Regensburger M, Winkler J. Adult Neurogenesis in Parkinson's Disease. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(3):459–73.
107. Regensburger M, Prots I, Winner B. Adult Hippocampal Neurogenesis in Parkinson's Disease: Impact on Neuronal Survival and Plasticity. *Neural Plast*. 2014;2014.
108. Przedborski S, Leviver M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, et al. Dose-dependent Lesions of the Dopaminergic Nigrostriatal Pathway Induced by Intrastratial Injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. 1995;67(3):631–47.
109. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and New Animal Models of Parkinson's Disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.
110. Gubellini P, Kachidian P. Animal Models of Parkinson's Disease: An Updated Overview. *Rev Neurol (Paris)*. 2015;171(11):750–61.
111. Jackson-Lewis V, Blesa J, Przedborski S. Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18:S183–5.
112. Büeler H. Impaired Mitochondrial Dynamics and Function in The Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Exp Neurol*. 2009;218(2):235–46.
113. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The Herbicide Paraquat Causes Up-regulation and Aggregation of Alpha-synuclein in Mice: Paraquat and Alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 2002;277(3):1641–4.
114. Betarbet R, Greenamyre JT. Complex I Inhibition, Rotenone and Parkinson's Disease. Nass R, Przedborski J *Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights From Model Systems Elsevier*; 2008
115. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A Highly Reproducible Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Neurobiol Dis*.

- 2009;34(2):279–90.
116. Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. Lessons From The Rotenone Model of Parkinson's Disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(4):141–2.
 117. Blesa J, Przedborski S. Parkinson's Disease: Animal Models and Dopaminergic Cell Vulnerability. *Front Neuroanat.* 2014;8(December):1–12.
 118. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron.* 2003;39:889–909.
 119. Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL, et al. A Novel Alpha-synuclein Missense Mutation in Parkinson Disease. *Neurology.* 2013;80(March):1062–4.
 120. Maingay M. The Susceptibility of Mesencephalic Neurons to Human Mutant Alpha-Synuclein Overexpression in Rat and Mouse [Doktora Tezi]. Lund: Lund University; 2006.
 121. Dehay B, Fernagut PO. Alpha-synuclein-based Models of Parkinson's Disease. *Rev Neurol (Paris).* 2016;172(6–7):371–8.
 122. Decressac M, Mattsson B, Björklund A. Comparison of the Behavioural and Histological Characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein Rat Models of Parkinson's Disease. *Exp Neurol.* 2012;235(1):306–15.
 123. Löw K, Aebischer P. Use of Viral Vectors to Create Animal Models for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012;48(2):189–201.
 124. Lauwers E, Debyser Z, Dorpe J, Strooper B, Nuttin B, Baekelandt V. Neuropathology and Neurodegeneration in Rodent Brain Induced by Lentiviral Vectormediated Overexpression of α -Synuclein. *Brain Pathol.* 2003;13(3):364–72.
 125. Yamada M, Iwatsubo T, Mizuno Y, Mochizuki H. Overexpression of Alpha-synuclein in Rat Substantia Nigra Results in Loss of Dopaminergic Neurons, Phosphorylation of Alpha-synuclein and Activation of Caspase-9: Resemblance to Pathogenetic Changes in Parkinson's Disease. *J Neurochem.* 2004;91(2):451–61.
 126. Gorbatyuk OS, Li S, Sullivan LF, Chen W, Kondrikova G, Manfredsson FP, et al. The Phosphorylation State of Ser-129 in Human Alpha-synuclein Determines Neurodegeneration in a Rat Model of Parkinson Disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(2):763–8.
 127. Da Silveira SA, Schneider BL, Cifuentes-Diaz C, Sage D, Abbas-Terki T, Iwatsubo T, et al. Phosphorylation Does Not Prompt, Nor Prevent, The Formation of Alpha-synuclein Toxic Species in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet.* 2009;18(5):872–87.
 128. Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Björklund A. Progressive Neurodegenerative and Behavioural Changes Induced by AAV-mediated

- Overexpression of Alpha-synuclein in Midbrain Dopamine Neurons. *Neurobiol Dis.* 2012;45(3):939–53.
129. Gombash SE, Manfredsson FP, Kemp CJ, Kuhn NC, Fleming SM, Egan AE, et al. Morphological and Behavioral Impact of AAV2/5-mediated Overexpression of Human Wild Type Alpha-synuclein in The Rat Nigrostriatal System. *PLoS One.* 2013;8(11):1–15.
 130. Oliveras-Salvá M, Van der Perren A, Casadei N, Stroobants S, Nuber S, D’Hooge R, et al. rAAV2/7 vector-mediated Overexpression of Alpha-synuclein in Mouse Substantia Nigra Induces Protein Aggregation and Progressive Dose-dependent Neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2013;8(1):44.
 131. Van der Perren A, Toelen J, Casteels C, Macchi F, Van Rompuy AS, Sarre S, et al. Longitudinal Follow-up and Characterization of a Robust Rat Model for Parkinson’s Disease Based on Overexpression of Alpha-synuclein with Adeno-associated Viral Vectors. *Neurobiol Aging.* 2015;36(3):1543–58.
 132. Bourdenx M, Dovero S, Engeln M, Bido S, Bastide MF, Duthel N, et al. Lack of Additive Role of Ageing in Nigrostriatal Neurodegeneration Triggered by Alpha-synuclein Overexpression. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3(1):46.
 133. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron.* 2004;44(4):595–600.
 134. Li Y, Liu W, Oo TF, Wang L, Tang Y, Jackson-Lewis V, et al. Mutant LRRK2R1441G BAC Transgenic Mice Recapitulate Cardinal Features of Parkinson’s Disease. *Nat Neurosci.* 2009;12(7):826–8.
 135. Chen C-Y, Weng Y-H, Chien K-Y, Lin K-J, Yeh T-H, Cheng Y-P, et al. (G2019S) LRRK2 Activates MKK4-JNK Pathway and Causes Degeneration of SN Dopaminergic Neurons in a Transgenic Mouse Model of PD. *Cell Death Differ.* 2012;19(10):1623–33.
 136. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the Parkin Gene Cause Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism. *Nature.* 1998;392(6676):605–8.
 137. Lu X-H, Fleming SM, Meurers B, Ackerson LC, Mortazavi F, Lo V, et al. Bacterial Artificial Chromosome Transgenic Mice Expressing a Truncated Mutant Parkin Exhibit Age-Dependent Hypokinetic Motor Deficits, Dopaminergic Neuron Degeneration, and Accumulation of Proteinase K-Resistant Alpha-Synuclein. *J Neurosci.* 2009;29(7):1962–76.
 138. Van Rompuy A-S, Lobbestael E, Van der Perren A, Van den Haute C, Baekelandt V. Long-term Overexpression of Human Wild-Type and T240R Mutant Parkin in Rat Substantia Nigra Induces Progressive Dopaminergic Neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(2):159–74.
 139. Valente EM, Abou-sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary Early-Onset Parkinson’s Disease Caused by Mutations in PINK1.

- 2004;304(May):1158–61.
140. Gautier CA, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 Causes Mitochondrial Functional Defects and Increased Sensitivity to Oxidative Stress. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(32):11364–9.
 141. Gispert S, Ricciardi F, Kurz A, Azizov M, Hoepken HH, Becker D, et al. Parkinson Phenotype in Aged PINK1-deficient Mice Is Accompanied by Progressive Mitochondrial Dysfunction in Absence of Neurodegeneration. *PLoS One.* 2009;4(6).
 142. Bonifati V. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science.* 2003;299(5604):256–9.
 143. Rousseaux MWC, Marcogliese PC, Qu D, Hewitt SJ, Seang S, Kim RH, et al. Progressive Dopaminergic Cell Loss with Unilateral-to-Bilateral Progression in a Genetic Model of Parkinson Disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(39):15918–23.
 144. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Third Edit. English. 2005. 209 p.
 145. Ennaceur A, Delacour J. A New One-trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. III. Spatial vs. Non-spatial Working Memory. *Behav Brain Res.* 1988;(1):83–92.
 146. Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place Navigation Impaired in Rats with Hippocampal Lesions. *Nature.* 1982;297(5868):681–3.
 147. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of Open:Closed Arm Entries in An Elevated Plus-maze as A Measure of Anxiety in The Rat. *J Neurosci Methods.* 1985;14(3):149–67.
 148. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of Sucrose Preference by Chronic Unpredictable Mild Stress, and Its Restoration by a Tricyclic Antidepressant. *Psychopharmacology (Berl).* 1987;93(3):358–64.
 149. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS Plasticity and Assessment of Forelimb Sensorimotor Outcome in Unilateral Rat Models of Stroke, Cortical Ablation, Parkinsonism and Spinal Cord Injury. *Neuropharmacology.* 2000;39(5):777–87.
 150. Ungerstedt U. Postsynaptic Supersensitivity after 6-Hydroxy-dopamine Induced Degeneration of the Nigro-striatal Dopamine System. *Acta Physiol Scand.* 1971;82(S367):69–93.
 151. Schwarting RKW, Huston JP. The Unilateral 6-hydroxydopamine Lesion Model in Behavioral Brain Research. Analysis of Functional Deficits, Recovery and Treatments. *Prog Neurobiol.* 1996;50:275–331.
 152. Yalcin-Cakmakli G. Parkinsonizm Modelinde L-DOPA Diskinezisine Eşlik Eden Striatal Presinaptik Nörotransmitter Salıverilmesi ile İlişkili Proteinler [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2009.

153. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85.
154. Kirik D, Annett LE, Burger C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A. Nigrostriatal Alpha-synucleinopathy Induced by Viral Vector-mediated Overexpression of Human Alpha-synuclein: A New Primate Model of Parkinson's Disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(5):2884-9.
155. Yamada M, Mizuno Y, Mochizuki H. Parkin Gene Therapy for Alpha-Synucleinopathy: A Rat Model of Parkinson's Disease. *Hum Gene Ther.* 2005;16(2):262-70.
156. Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S. Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. *PLoS One.* 2013;8(9):1-16.
157. Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum S, Bolshakov VY. Essential Roles in Synaptic Plasticity for Synaptogyrin I and Synaptophysin I. *Neuron* 1999;24(3):687-700.
158. Ulusoy A, Sahin G, Björklund T, Aebischer P, Kirik D. Dose Optimization for Long-term rAAV-mediated RNA Interference in the Nigrostriatal Projection Neurons. *Mol Ther.* 2009;17(9):1574-84.
159. Lee AS, Duman RS, Pittenger C. A Double Dissociation Revealing Bidirectional Competition Between Striatum and Hippocampus During Learning. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(44):17163-8.
160. Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, et al. Pathological Alpha-synuclein Propagates Through Neural Networks. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2(1):88.
161. Sacino AN, Brooks M, Thomas MA, McKinney AB, Lee S, Regenhardt RW, et al. Intramuscular Injection of Alpha-synuclein Induces CNS Alpha-synuclein Pathology and A Rapid-onset Motor Phenotype in Transgenic Mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(29):10732-7.
162. Sulzer D, Surmeier DJ. Neuronal Vulnerability, Pathogenesis, and Parkinson's Disease. Vol. 28, *Movement Disorders.* 2013. p. 715-24.
163. Maingay M, Romero-Ramos M, Carta M, Kirik D. Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons Are Resistant to Human Mutant Alpha-synuclein Overexpression. *Neurobiol Dis.* 2006;23(3):522-32.
164. Solari N, Bonito-Oliva A, Fisone G, Brambilla R. Understanding Cognitive Deficits in Parkinson's Disease: Lessons from Preclinical Animal Models. *Learn Mem.* 2013;20(10):592-600
165. Lewis SJG, Dove A, Robbins TW, Barker RA, Owen AM. Cognitive Impairments in Early Parkinson's Disease Are Accompanied by Reductions in Activity in Frontostriatal Neural Circuitry. *J Neurosci.* 2003;23(15):6351-6.

166. Rinne JO, Portin R, Ruottinen H, Nurmi E, Bergman J, Haaparanta M, et al. Cognitive Impairment and the Brain Dopaminergic System in Parkinson Disease. *Arch Neurol*. 2000;57(4):470.
167. Palavra NC, Naismith SL, Lewis SJG. Mild Cognitive Impairment in Parkinson's Disease: A Review of Current Concepts *Neurology Research International*, vol. 2013, Article ID 576091, 2013. doi:10.1155/2013/576091.
168. Grayson B, Leger M, Piercy C, Adamson L, Harte M, Neill JC. Assessment of Disease-related Cognitive Impairments Using the Novel Object Recognition (NOR) Task in Rodents. *Behav Brain Res*. 2015;285:176–93.
169. Fernandes VS, Ribeiro AM, Melo TG, Godinho M, Barbosa FF, Medeiros DS, et al. Memory Impairment Induced by Low Doses of Reserpine in Rats: Possible Relationship with Emotional Processing Deficits in Parkinson Disease. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2008;32(6):1479–83.
170. Goes ATR, Souza LC, Filho CB, Del Fabbro L, De Gomes MG, Boeira SP, et al. Neuroprotective Effects of Swimming Training in A Mouse Model of Parkinson's Disease Induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. 2014;256:61–71.
171. Fernandes VS, Santos JR, Leao AHFF, Medeiros AM, Melo TG, Izidio GS, et al. Repeated Treatment with A Low Dose of Reserpine as A Progressive Model of Parkinson's Disease. *Behav Brain Res*. 2012;231(1):154–63.
172. Bonito-Oliva A, Pignatelli M, Spigolon G, Yoshitake T, Seiler S, Longo F, et al. Cognitive Impairment and Dentate Gyrus Synaptic Dysfunction in Experimental Parkinsonism. *Biol Psychiatry*. 2014;75(9):701–10.
173. Sy HN, Wu SL, Wang WF, Chen CH, Huang YT, Liou YM, et al. MPTP-induced Dopaminergic Degeneration and Deficits in Object Recognition in Rats Are Accompanied by Neuroinflammation in the Hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010;95(2):158–65.
174. Ho YJ, Ho SC, Pawlak CR, Yeh KY. Effects of D-cycloserine on MPTP-induced Behavioral and Neurological Changes: Potential for Treatment of Parkinson's Disease Dementia. *Behav Brain Res*. 2011;219(2):280–90.
175. Moriguchi S, Yabuki Y, Fukunaga K. Reduced Calcium/calmodulin-dependent Protein Kinase II Activity in The Hippocampus Is Associated with Impaired Cognitive Function in MPTP-treated Mice. *J Neurochem*. 2012;120(4):541–51.
176. Ho SC, Hsu CC, Pawlak CR, Tikhonova MA, Lai TJ, Amstislavskaya TG, et al. Effects of Ceftriaxone on The Behavioral and Neuronal Changes in An MPTP-induced Parkinson's Disease Rat Model. *Behav Brain Res*. 2014;268:177–84.
177. Santos JR, Cunha JAS, Dierschnabel AL, Campelo CLC, Leao AHFF, Silva AF, et al. Cognitive, Motor and Tyrosine Hydroxylase Temporal Impairment in A Model of Parkinsonism Induced by Reserpine. *Behav Brain Res*. 2013;253:68–77.

178. Magen I, Fleming SM, Zhu C, Garcia EC, Cardiff KM, Dinh D, et al. Cognitive Deficits in A Mouse Model of Pre-manifest Parkinson's Disease. *Eur J Neurosci*. 2012;35(6):870–82.
179. Tatenhorst L, Eckermann K, Dambeck V, Fonseca-Ornelas L, Walle H, Lopes da Fonseca T, et al. Fasudil Attenuates Aggregation of Alpha-synuclein in Models of Parkinson's Disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):39.
180. Chao OYH, Pum ME, Huston JP. The Interaction Between The Dopaminergic Forebrain Projections and The Medial Prefrontal Cortex is Critical for Memory of Objects: Implications for Parkinson's Disease. *Exp Neurol*. 2013;247:373–82.
181. Cohen SJ, Stackman RW. Assessing Rodent Hippocampal Involvement in The Novel Object Recognition Task. A Review. *Behav Brain Res*. 2015;285:105–17.
182. Gaskin S, Tremblay A, Mumby DG. Retrograde and Anterograde Object Recognition in Rats with Hippocampal Lesions. *Hippocampus*. 2003;13(8):962–9.
183. Brown MW, Banks PJ. In Search of A Recognition Memory Engram. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;50:12–28.
184. Warburton EC, Brown MW. Neural Circuitry for Rat Recognition Memory. *Behav Brain Res*. 2015;285:131–9.
185. Yonelinas AP, Aly M, Wang W, Koen JD. Recollection and Familiarity: Examining Controversial Assumptions and New Directions. *Hippocampus*. 2010;20(11):1178–94.
186. Vann SD, Albasser MM. Hippocampus and Neocortex: Recognition and Spatial Memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2011;21(3):440–5.
187. Schneider CB, Linse K, Schönfeld R, Brown S, Koch R, Reichmann H, et al. Spatial Learning Deficits in Parkinson's Disease with and without Mild Cognitive Impairment. *Parkinsonism Relat Disord*. 2017;36:83–8.
188. Da Cunha C, Wietzikoski S, Wietzikoski EC, Miyoshi E, Ferro MM, Anselmo-Franci JA, et al. Evidence for The Substantia Nigra Pars Compacta as An Essential Component of A Memory System Independent of The Hippocampal Memory System. *Neurobiol Learn Mem*. 2003;79(3):236–42.
189. Sukumar D, Rengaswamy M, Chakravarthy VS. Modeling the Contributions of Basal Ganglia and Hippocampus to Spatial Navigation Using Reinforcement Learning. *PLoS One*. 2012;7(10).
190. Thurm F, Schuck NW, Fauser M, Doeller CF, Stankevich Y, Evens R, et al. Dopamine Modulation of Spatial Navigation Memory in Parkinson's Disease. *Neurobiol Aging*. 2016;38:93–103.
191. De Hoz L, Moser EI, Morris RGM. Spatial Learning with Unilateral and Bilateral Hippocampal Networks. *Eur J Neurosci*. 2005;22(3):745–54.
192. Assogna F, Cravello L, Caltagirone C, Spalletta G. Anhedonia in Parkinson's Disease: A Systematic Review of The Literature. *Mov Disord*.

- 2011;26(10):1825–34.
193. Loas G, Krystkowiak P, Godefroy O. Anhedonia in Parkinson's Disease: An Overview. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2012;24(4):444–51.
 194. Campos FL, Carvalho MM, Cristovão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, et al. Rodent Models of Parkinson's Disease: Beyond the Motor Symptomatology. *Front Behav Neurosci*. 2013;7:1–11.
 195. Der-Avakian A, Markou A. The Neurobiology of Anhedonia and Other Reward-Related Deficits. *Trends Neurosci*. 2012 Jan;35(1):68-77.
 196. Kelley AE, Bakshi VP, Haber SN, Steininger TL, Will MJ, Zhang M. Opioid Modulation of Taste Hedonics within the Ventral Striatum. *Physiol Behav*. 2002;76(3):365–77.
 197. Berridge KC, Kringelbach ML. Affective Neuroscience of Pleasure: Reward in Humans and Animals. Vol. 199, *Psychopharmacology*. 2008. p. 457–80.
 198. Faure A, Richard JM, Berridge KC. Desire and Dread From The Nucleus Accumbens: Cortical Glutamate and Subcortical GABA Differentially Generate Motivation and Hedonic Impact in The Rat. *PLoS One*. 2010;5(6).
 199. Zimmermann PK, Wagner U, Krauth J, Huston JP. Unilateral Lesion of Dorsal Hippocampus Enhances Reinforcing Lateral Hypothalamic Stimulation in The Contralateral Hemisphere. *Brain Res Bull*. 1997;44(3):265–71.
 200. Kelley SP, Mittleman G. Effects of Hippocampal Damage on Reward Threshold and Response Rate During Self-stimulation of The Ventral Tegmental Area in The Rat. *Behav Brain Res*. 1999;99(2):133–41.
 201. Chambers RA, Self DW. Motivational Responses to Natural and Drug Rewards in Rats with Neonatal Ventral Hippocampal Lesions: An Animal Model of Dual Diagnosis Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(6):889–905.
 202. Prediger RDS, Matheus FC, Schwarzbald ML, Lima MMS, Vital MABF. Anxiety in Parkinson's Disease: A Critical Review of Experimental and Clinical Studies. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):115–24.
 203. Eskow Jaunarajs K. Potential Mechanisms Underlying Anxiety and Depression in Parkinson's Disease: Consequences of L-DOPA Treatment. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):556–64.
 204. Taylor TN, Greene JG, Miller GW. Behavioral Phenotyping of Mouse Models of Parkinson's Disease. *Behav Neurosci*. 2011;211(1):1–10.
 205. Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. *Neuron*. 2016;89(4):857–66.
 206. Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, et al. Regional Dissociations within The Hippocampus: Memory and Anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004;28(3):273–83.

207. Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach H-A, Murison R, Moser EI, Moser M-B. Reduced Fear Expression After Lesions of The Ventral Hippocampus. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(16):10825–30.
208. Weeden CSS, Roberts JM, Kamm AM, Kesner RP. The Role of The Ventral Dentate Gyrus in Anxiety-based Behaviors. *Neurobiol Learn Mem.* 2015;118:143–9.
209. Rivadeneyra-Domínguez E, Rodríguez-Landa JF. Motor Impairments Induced by Microinjection of Linamarin in The Dorsal Hippocampus of Wistar Rats. *Neurologia.* 2016;31:516–22.
210. Ramos-Languren LE, González-Piña R, Montes S, Chávez-García N, Ávila-Luna A, Barón-Flores V, et al. Sensorimotor Recovery from Cortical Injury Is Accompanied by Changes on Norepinephrine and Serotonin Levels in The Dentate Gyrus and Pons. *Behav Brain Res.* 2016;297:297–306.
211. Seo HG, Kim DY, Park HW, Lee SU, Park SH. Early Motor Balance and Coordination Training Increased Synaptophysin in Subcortical Regions of The Ischemic Rat Brain. *J Korean Med Sci.* 2010;25(11):1638–45.
212. Beninger RJ. The Role of Dopamine in Locomotor Activity and Learning. *Brain Res Rev.* 1983;6(2):173–96.
213. Song LK, Ma KL, Yuan YH, Mu Z, Song XY, Niu F, et al. Targeted Overexpression of Alpha-synuclein by rAAV2/1 Vectors Induces Progressive Nigrostriatal Degeneration and Increases Vulnerability to MPTP in Mouse. *PLoS One.* 2015;10(6):1–19.
214. Korecka J, Schouten M, Eggers R, Ulusoy A, Bossers K, Verhaagen J. Comparison of AAV Serotypes for Gene Delivery to Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra. Xu K. Editor. *Viral Gene Therapy 2011; InTech*, DOI: 10.5772/18939.
215. Di Chiara G, Porceddu ML, Vargiu L, Argiolas a, Gessa GL. Evidence for Dopamine Receptors Mediating Sedation in The Mouse Brain. *Nature.* 1976;264(5586):564–7.
216. Radhakishun FS, Van Ree JM. The Hypomotility Elicited by Small Doses of Apomorphine Seems Exclusively Mediated by Dopaminergic Systems in The Nucleus Accumbens. *Eur J Pharmacol.* 1987;137(1):41–7.
217. Miller R, Beninger RJ. On the Interpretation of Asymmetries of Posture and Locomotion Produced with Dopamine Agonists in Animals with Unilateral Depletion of Striatal dopamine. *Prog Neurobiol.* 1991;36(3):229–56.
218. Oades RD, Taghzouti K, Rivet JM, Simon H, Le Moal M. Locomotor Activity in Relation to Dopamine and Noradrenaline in The Nucleus Accumbens, Septal and Frontal Areas: A 6-Hydroxydopamine Study. *Neuropsychobiology.* 1986;16.
219. Hedou G, Feldon J, Heidbreder CA. Effects of Cocaine on Dopamine in Subregions of the Rat Prefrontal Cortex and Their Efferents to Subterritories of

The Nucleus Accumbens. *Eur J Pharmacol.* 1999;372(2):143–55.

220. Lane EL, Cheetham S, Jenner P. Dopamine Uptake Inhibitor-Induced Rotation in 6-hydroxydopamine-lesioned Rats Involves Both D1 and D2 Receptors But Is Modulated Through 5-hydroxytryptamine and Noradrenaline Receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(3):1124–31.



8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: 52338575

13 2014

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 22.07.2014 (SALİ)
TOPLANTI SAYISI	: 2014/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2014/44
KARAR NUMARASI	: 2014/44-10
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL, Ecz. Uğur Sevgi MUTLUAY, Uzm. Dr. Gül Yalçın ÇAKMAKLI, Uzm. Ecz. İnci KAZKAYASI, Ecz. Gökçen TELLİ ve Ecz. Elif ÇINAR
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Bülent ELİBOL, Prof. Dr. Esen Saka TOPÇUOĞLU, Dr. Ayşe ULUSOY ve Doç. Dr. A. C. Sinan YÜRÜKER
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 120 adet sıçan

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL'in araştırma yürütücüsü olduğu 2014/44 kayıt numaralı "*Bazal Ganglia ve Hipokampuse Unilateral AAV-Aracılı Alfa - Sinükleinin Enjeksiyonu ile Oluşturulan Parkinson Hastalığı Modelinin Davranışsal ve Patolojik Olarak Değerlendirilmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Yrd.Doç.Dr.Banu Cahide TEL çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Ömer GÖRDUYSUS
Başkan Yardımcısı

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Sevgi Uğur MUTLUAY
Doğum Yeri ve Tarihi Tekirdağ, 23 Kasım 1989
Adres Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji Anabilim Dalı, 06100 Sıhhiye-Ankara
Tel: (312) 305 2131,
Mobil: (0536) 2926245
E-posta: sevgimutluay@gmail.com

Öğrenim Durumu

2003-2007 Kırklareli Anadolu Lisesi
2007-2012 Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (BSc)
2013- Hacettepe Üniversitesi
Farmakoloji Programı Yüksek Lisans (MSc)

Üyesi olduğu bilimsel ve sosyal kuruluşlar

2015- Türk Farmakoloji Derneği

Bilimsel ilgi alanları Parkinson hastalığı

Araştırma deneyimleri

In vivo:
- Stereotaksik enjeksiyon,
- Bilişsel davranış deneyleri
- Motor davranış deneyleri
In vitro:
- İmmünohistokimya
- İmmünoblotlama

Projeler:

2014- 2017 **Proje adı:** Bazal ganglia ve hipokampüse unilateral AAV-aracılı alfa-sinükleinin enjeksiyonu ile oluşturulan

Parkinson Hastalığı modelinin davranışsal ve patolojik olarak değerlendirilmesi

Destek: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Araştırmacı

Yürütücü: Yard. Doç Dr. Banu Cahide TEL

Bildiriler

- Çınar E., Çakmaklı-Yalçın G., **Mutluay S.**, Telli G., Kazkayası İ., Ulusoy B., Saka E., Elibol B., Tel BC. Adeno ilişkili Viral Vektör Aracılı Parkinson Hastalığı Modelinde Dentat Girusta Alfa- Sinüklein Aşırı İfadesine Bağlı Bilişsel Fonksiyon Değişikliklerinin Davranışsal ve Histopatolojik Değerlendirmesi 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 7-10 Eylül 2015, Ankara
- Tel BC., Çakmaklı-Yalçın G., Çınar E., **Mutluay S.**, Telli G., Saka E., Ulusoy A., Elibol B. Cognitive dysfunction due to over expression of alpha-synuclein hippocampus by using viral vector based approach: Modeling cognitive decline in PD.The MDS 19th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 14-18 Jun 2015, San Diego, CA/USA
- Yalçın Çakmaklı, G., Çınar, E., **Mutluay, S.U.**, Telli, G., Kazkayası, I., Tel , B.C., Ulusoy, A., Saka Topçuoğlu, E., Elibol, B., (2015). Does higher alpha-synuclein aggregate density lead to more severe dopaminergic cell loss in the AAV-mediated over-expression model of PD. Neurizons 2015 – Notes of an Orchestrated Brain 26-29 May 2015, Göttingen, Germany.
- Yalçın-Çakmaklı G., Çınar E., **Mutluay SU.**, Kazkayası İ., Telli G., Saka E., Ulusoy B., Elibol B., Tel BC Hipokampüste AAV-aracılı alfa-sinüklein aşırı ifadesi ile PH modelinde kognitif değişiklikler oluşturulabilir mi?. 12. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28-31 Mayıs 2014, İstanbul
- Çınar E., Kazkayası İ., Telli G., **Mutluay SU.**, Yalçın-Çakmaklı G., Saka E., Ulusoy B., Elibol B., Tel BC. Adeno-ilişkili viral vektör aracılı Parkinson Hastalığı modeli: Alfa-sinüklein ifadesinin neden olduğu motor ve davranışsal değişiklikler. 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 4-7 Kasım 2013, Antalya